

**'*CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM*' I MOROT  
OCH PALSTERNACKA FRÅN EGENTLIGA FINLAND,  
SATAKUNDA OCH SÖDRA SAVOLAX**

Annika Wickström  
Magisteravhandling  
Helsingfors universitet  
Institutionen för  
lantbruksvetenskaper  
Växtpatologi  
02-2020

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Agrikultur-forstvetenskapliga fakulteten		Laitos — Institution — Department Institutionen för lantbruksvetenskaper	
Tekijä — Författare — Author Annika Wickström			
Työn nimi — Arbetets titel — Title ' <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ' i morot och palsternacka från Egentliga Finland, Satakunda och Södra Savolax			
Oppiaine — Läroämne — Subject Växtpatologi			
Työn laji — Arbetets art — Level Magisteravhandling		Aika — Datum — Month and year 02-2020	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 84 s.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>'<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>' (CLso) är en allmän bakterie i morot i södra och västra Finland, men förekommer även i Savolax. Bakterien är en obligat parasit som lever och förökar sig i växtens floem och sprids med bladloppan <i>Trioza apicalis</i>. I Spanien, Frankrike och Finland har CLso även påvisats i palsternacka. Målet med denna avhandling var att undersöka bakteriens förekomst och genetiska mångfald i morot och palsternacka i Satakunda, Egentliga Finland och Södra Savolax från sådana palsternacka- och morotsodlingar där missfärgning i blad och morotsbladlappar har upptäckts.</p> <p>Alla proven insamlades på basis av symptom på bladmissfärgning. Från ett morotsfält och ett palsternackafält i Satakunda insamlades fyra vilda växter från familjen Polygonaceae. Växterna uppvisade liknande symptom på missfärgning i bladen som morötterna. Ytterligare insamlingskriterier för morotsproven var förekomsten av bladlappar och bladkrusighet. Prov av palsternacka insamlades från gårdar där morot odlades på närliggande skiften och där man hade upptäckt morotsbladlappar. Proven analyseras med realtids-PCR med en startsekvens kombination, som är specifik för CLso. Proven med hög bakterietiter valdes ut för sekvensering och bestämning av haplotyp.</p> <p>CLso bekräftades i 62,9 % av de undersökta morotsproven, i 90,8 % av palsternacka blastproven och i 76,9 % av palsternacka rotproven. CLso bekräftades också i alla prov av de insamlade vilda växterna.</p> <p>På basis av <i>ftsZ</i> gensekvens upptäcktes en ny haplotyp av CLso i tre palsternacka prov och två prov av pilört (<i>Persicaria lapathifolia</i> (L.) Gray). Den nya haplotypen har fått namnet haplotyp H. Denna haplotyp är den nionde av alla för tillfället bekräftade haplotyper av CLso.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords ' <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ', morot, palsternacka, bladloppa, <i>Trioza apicalis</i>			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Institutionen för lantbruksvetenskaper och campusbiblioteket i Vik			
Muuta tietoa — Övriga uppgifter — Further information Arbetet handledes av Minna Haapalainen			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Annika Wickström			
Työn nimi — Arbetets titel — Title ' <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ' in carrot and parsnip from Satakunta, Southwest Finland and South Savonia			
Oppiaine — Läroämne — Subject Plant Pathology			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis	Aika — Datum — Month and year 02-2020	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 84 p.	
Tiivistelmä — Referat — Abstract  <p>'<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>' (CLso) is a frequent bacterium in carrot in southern and western Finland but is also occurring in South Savonia. The bacterium is unculturable, lives as a parasite and multiplies in the phloem vessels and is transmitted by the carrot psyllid <i>Trioza apicalis</i>. In Spain, France and Finland the bacterium has also been found in parsnip. The aim of this thesis was to study the occurrence and genetic variation of this bacterium in carrot and parsnip in Satakunda, Southwest Finland and South Savonia from such parsnip and carrot fields where psyllids and discolouration symptoms in foliage have been detected.</p> <p>All the samples were collected based on foliar discolouration symptoms. Four wild plants from the family Polygonaceae were collected from one carrot field and one parsnip field in Satakunda. These plants showed similar foliar discolouration as the carrots. Other criteria for collecting the carrot samples was based on occurrence of psyllids and leaf curling. Samples of parsnips were collected from vegetable farms, where parsnips were grown nearby the carrot fields and where psyllids had been detected. The samples were analysed by real-time PCR with primer combination specific to CLso. Those samples that had high amounts of bacteria were chosen for sequencing and detection of haplotype.</p> <p>CLso was detected in 62,9 % of the carrot samples, in 90,8 % of the parsnip foliage samples and in 76,9 % of the parsnip root samples and in all the samples of symptomatic wild plants.</p> <p>Based on the <i>ftsZ</i> gene sequence, a new haplotype of CLso, named haplotype H, was identified in three of the parsnip samples from Satakunda and in two samples of pale persicaria (<i>Persicaria lapathifolia</i> (L.) Gray). This is the ninth haplotype of CLso identified.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords ' <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ', carrot, parsnip, psyllid			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisor: Minna Haapalainen			

# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>1 INLEDNING .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Odling av morot och palsternacka i Finland .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 'Candidatus' Liberibacter solanacearum .....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Fem arter av bladloppor har sammankopplats med CLso .....	9
1.2.2 Unga morotsplantor mest känsliga mot angrepp av morotsbladloppa .....	10
1.2.3 CLso morfologi och systemisk infektion av värdväxten .....	10
1.2.4 Åtta haplotyper har identifierats .....	11
1.2.5 Variation inom CLso haplotyper har identifierats med MLST .....	12
1.2.6 Genen <i>ftsZ</i> användbar för identifiering av olika haplotyper .....	12
1.2.7 Bladmissfärgningar associeras med CLso .....	13
1.2.8 Oklart ännu hur CLso bakterien sprids mellan olika växtarter .....	13
<b>2 STUDIENS MÅLSÄTTNING .....</b>	<b>16</b>
<b>3 MATERIAL OCH METODER .....</b>	<b>16</b>
3.1 Insamling av växtprov .....	16
3.2 DNA extrahering .....	17
3.3 PCR metoder .....	17
3.4 Analys av positiva prov för bestämning av haplotyp .....	18
3.5 DNA sekvensering .....	20
3.6 Fylogenetisk analys .....	20
3.7 Statistisk analys .....	21
<b>4 RESULTAT .....</b>	<b>23</b>
4.1 Visuell utvärdering av morots- och palsternackaproven .....	23
4.2 Förekomst av CLso i morot och palsternacka .....	24
4.3 Mängden CLso templat i morot och palsternacka .....	25
4.4 Korrelation mellan rot- och blastvikt samt rot/blastvikt förhållandet och mängden CLso templat / ng DNA .....	29
4.4.1 Korrelation mellan rot- och blastvikt .....	29
4.4.2 Korrelation mellan rot/blastvikt förhållandet och CLso templat / ng DNA .....	29
4.4.3 Rot- och blastvikt i förhållande till CLso templat /ng DNA .....	31
4.5 Identifiering av amplifierade DNA fragment .....	33
4.6 Förekomst av CLso i vilda växter .....	34
4.7 Fylogenetisk analys .....	35
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
5.1 Förekomst av CLso i morot och palsternacka .....	39
5.1.1 Bakteriemängd i morot och palsternacka .....	39
5.1.2 Odlingssäsongens temperatur .....	41
5.1.3 Fördelning av CLso i morot och palsternacka .....	42
5.1.4 Korrelation mellan CLso infektion och rotvikt .....	43
5.1.5 Samband mellan CLso infektion och rot:blast förhållande i Satakunda .....	44
5.2 Förekomst av CLso i vilda växter .....	44
5.3 Fylogenetiska analyser .....	45
<b>6 SLUTSATSER .....</b>	<b>46</b>

<b>7 TACK.....</b>	<b>48</b>
<b>KÄLLFÖRTECKNING .....</b>	<b>49</b>
<b>BILAGA 1 DNEASY® PLANT MINI KIT QUICK-START PROTOKOLL .....</b>	<b>55</b>
<b>BILAGA 2 UTSPÄDNINGSTABELL .....</b>	<b>56</b>
<b>BILAGA 3 SOND-QPCR PROTOKOLL FÖR DETEKTERING AV CLSO .....</b>	<b>59</b>
<b>BILAGA 4 QIAQUICK® PCR PURIFICATION KIT (250) .....</b>	<b>62</b>
<b>BILAGA 5 UTRÄKNING AV RELATIV BAKTERIETITER.....</b>	<b>63</b>
<b>BILAGA 6 SEKVENSLISTA AV GENREGIONEN <i>FTSZ</i> OCH DESS PROTEINSAMMANSÄTTNING FÖR JÄMFÖRELSE AV GENOTYPER AV '<i>CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM</i>'. .....</b>	<b>66</b>
<b>BILAGA 7 SEKVENSLISTA AV GENREGIONEN <i>FTSZ</i> FÖR GENOTYP JÄMFÖRELSE AV '<i>CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM</i>'. ....</b>	<b>77</b>
<b>BILAGA 8 UPPSTÄLLNING AV GENREGIONEN <i>FTSZ</i> PROTEINSAMMANSÄTTNING FÖR JÄMFÖRELSE AV GENOTYPER AV '<i>CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM</i>'. .....</b>	<b>83</b>

## FÖRKORTNINGAR OCH SYMBOLER

CLso	<i>'Candidatus' Liberibacter solanacearum</i>
COX	Cytokrom oxidas
C <sub>T</sub>	Gränsvärde då fluorescensen är starkare än det beslutade tröskelvärdet (Cycle threshold)
DNA	Deoxyribonukleinsyra
HLB	Citrus huanglongbing
MLST	Multi-lokus sekvensering (Multilocus sequence typing)
rRNA	Ribosomalt RNA
SEM	Svepelektronmikroskop (Scanning electron microscope)
SNP	Enbaspolymorfi (Single nucleotide polymorphism)
ST	Sekvenstyp
TEM	Transmissionselektronmikroskop (Transmission electron microscope)
qPCR	Kvantitativ direktanalyserad PCR (Polymerase Chain Reaction)

## 1 INLEDNING

Morot (*Daucus carota* L.) är en av de tre mest odlade frilandsgroönsakerna i Finland (Luke 2018) och odlingen är koncentrerad till de västra delarna av Finland (Tabell 1). Palsternacka (*Pastinaca sativa* L.) odlas i betydligt mindre omfattning men ofta på närbelägna skiften eller som en gröda i växtföljden (egen observation, Asko Hannukkala LUKE, skriftlig information, 28.12.2018). Både palsternackan och moroten hör till familjen flockblommiga växter (Apiaceae).

Morotsbladloppan (*Trioza apicalis* Förster) är den besvärligaste skadeinsekten, som orsakar stora skador i morotsodlingen i de nordliga länderna Finland, Sverige och Norge (Nehlin m. fl. 1994, Nissinen m. fl. 2012, Munyaneza m. fl. 2014). Skördeförlusterna kan till och med vara upp till 100 % i områden, som är lokaliserade nära granskogar (Nehlin m. fl. 1994). År 2008 observerades i södra Finland skador av morotsbladloppan i morot och ytterligare bladmissfärgning i gult och purpur, hämmad tillväxt i både blast och rot, samt rothårighet och morotsbladloppan sammankopplades då för första gången till 'Candidatus Liberibacter solanacearum' (CLso) (Munyaneza m. fl. 2010a, 2010b). Svårighetsgraden och omfattningen av CLso infektionen varierar årligen och är beroende av många faktorer, till exempel bladloppans population, dess naturliga fiender, väderförhållande, odlingsåtgärder samt användning av olika kultivarer (Nissinen m. fl. 2012).

CLso förknippas med många odlingsväxter, bland annat potatis (*Solanum tuberosum* L.), tomat (*Solanum lycopersicum* L.), paprika (*Capsicum annuum* L.), aubergine (*Solanum melongena* L.), tobak (*Nicotiana tabacum* L.), tamarillo (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendtn.) och tomatillo (*Physalis peruviana* L.) samt med vilda växter inom familjen Solanaceae (Liefting m. fl. 2009a, Munyaneza 2012, Haapalainen 2014, Hajri m. fl. 2017). I Europa har CLso påvisats både i morot och selleri (*Apium graveolens* L.) (Munyaneza m. fl. 2010a, Teresani m. fl. 2014). I Spanien, där morot och selleriodlingen är koncentrerad, orsakade CLso stora skördeförluster mellan åren 2008 - 2009 (Teresani m. fl. 2014). Alfaro-Fernández m. fl. (2017) undersökte förekomsten av CLso i 63 olika ogräs från morot- och sellerifält, men konstaterade att ogräsen inte utgjorde en smittokälla för patogenen. I Frankrike har förekomsten av CLso påvisats förutom i morot och selleri även i körvel (*Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm.), fänkål (*Foeniculum vulgare* Mill.),

persilja (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A. W. Hill) och palsternacka (Hajri m. fl. 2017). I Finland påvisades CLso i morot och ytterligare i flockblommiga växter, såsom palsternacka och hundkåx (*Anthriscus sylvestris* L.) och den allra senaste upptäckten av CLso gjordes i brännässla (*Urtica dioica* L.) (Haapalainen m. fl. 2017, 2018a).

Denna avhandling är en del av Helsingfors universitet (HY), Naturresursinstitutets (Luke) och Livsmedelsverkets projekt 'Candidatus Liberibacter solanacearum' -bakterin levinneisyys, tartuntalähteet ja kemppivektorit Suomessa. Ansvariga för projektet är Minna Pirhonen HY, Anne Nissinen Luke, Atro Virtanen ja Jukka Tegel Livsmedelsverket och finansiär är Jord- och skogsbruksministeriet (beslut 1506/03.01.02/2016).

## 1.1 Odling av morot och palsternacka i Finland

Morot (*Daucus carota* L.) är en av de tre mest odlade frilandsgroönsakerna i Finland, vilket framgår ur Naturresursinstitutets publicerade trädgårdsstatistik 2019. År 2018 odlades morot på totalt 1833 ha (Luke 2019), vilket utgör cirka 16 % av hela frilandsgroönsaksproduktionen i Finland (Tabell 1). Av landets totala morotsodling är cirka 56 % koncentrerad till både Egentliga Finland (603 ha) och Satakunda (427 ha) medan knappt 5 % av morotsodlingen är koncentrerad till Södra Savolax (106 ha). Palsternacka (*Pastinaca sativa* L.) odlades på totalt 131 ha (Luke 2019).

Tabell 1. Groönsaksproduktion på friland år 2018. Totalproduktion av morot och palsternacka enligt areal. Den procentuella arealen är jämförd med hela frilandsgroönsaksproduktionen enligt område (Luke 2019).

Område	Alla frilandsgroönsaker	Morot		Palsternacka	
	Areal (ha)	Areal (ha)	Areal %	Areal (ha)	Areal %
HELA LANDET	11 314	1 833	16,2	131	1,2
Egentliga Finland	3 732	603	16,2	52	1,4
Satakunda	2 278	427	18,7	46	2,0
Södra Savolax	606	106	17,5	5	0,8



## 1.2 'Candidatus' *Liberibacter solanacearum*

'*Candidatus* *Liberibacter solanacearum*' (CLso) är en gram-negativ bakterie i gruppen  $\alpha$ -*Proteobacteria*, vars levnadsområde är begränsat till växtens floem (Liefting m. fl. 2009b, EPPO 2013). Bakterien är inte odlingsbar och en obligat parasit, som sprids med bladloppor, som äter av växtsaften (Haapalainen m. fl. 2014). CLso har orsakat stora förluster både i potatis och morot samt i övriga odlingsväxter inom familjen Solanaceae och Apiaceae (Munyanzeza 2012, Haapalainen 2014). Den första stora epidemin bröt ut i USA år 2004 och orsakade stora skördeförluster för potatisodlarna i USA (Munyanzeza m. fl. 2007). I de infekterade potatisplantorna syntes skadorna i knölarna, vars ledningsvävnad var brunt missfärgad med nekrotiska fläckar och ibland med strimmig mörkgrön vävnad (Munyanzeza m. fl. 2007). Vid fritering av de skadade körlarna förvärrades symptomen ytterligare, varifrån sjukdomen också fått sitt namn Zebra chip (Munyanzeza m. fl. 2007). Eftersom sjukdomen före år 2004 hade förekommit sporadiskt och den ekonomiska inverkan hade varit marginell, hade man inte studerat hur omfattande sjukdomen förekom geografiskt (Munyanzeza m. fl. 2007).

### 1.2.1 Fem arter av bladloppor har sammankopplats med CLso

I och med utbrottet år 2004 inleddes forskningarna och under de kommande åren anknöts flera arter av bladloppor till CLso. I en studie av Munyanzeza m. fl. (2007) sammankopplades CLso bakterien med potatisbladloppan *Bactericera cockerelli* då forskarna i ett försök utsatte friska potatisplantor för bladloppor både i växthus och i fältförhållande. Forskare lyckades även experimentellt sprida CLso bakterien till olika kultivarer av potatis och tomat genom ympning med CLso smittat växtmaterial (Secor m. fl. 2009). Munyanzeza m. fl. (2010a, 2010b) associerade CLso bakterien till morot med morotsbladloppan *Trioza apicalis*, vilket även påvisades experimentellt några år senare i studien av Nissinen m. fl. (2014), då man i ett växthusförsök med CLso infekterade morotsbladloppor överförde CLso smittan till morotsplantor. I Spanien associerades CLso däremot med bladloppan *Bactericera trigonica* i selleri och morot (Alfaro-Fernández m. fl. 2012, Teresani m. fl. 2014). Haapalainen m. fl. (2018a) sammankopplade bladloppan *Trioza anthrisci* med hundkåx och *Trioza urticae* med brännässla i Finland. Trots att mer än 300 arter av bladloppor har identifierats så vet vi ytterst lite om deras värdväxter (Haapalainen m. fl. 2018a). Arterna är både monofaga, det vill säga arter

som är specialiserade på en värdväxt och oligofaga, arter som är specialiserade på närbesläktade värdväxter (Gertsson 2010). Enligt Munyaneza (2012) kan det finnas flera värdväxter och vektorer än vad vi för tillfället känner till.

### 1.2.2 Unga morotsplantor mest känsliga mot angrepp av morotsbladloppa

CLso är beroende av en levande värdväxt och för att spridas behövs vektorer, bladloppor, vilka är specialiserade till sin värdväxt (Kristoffersen m. fl. 2007). Bladloppans saliv innehåller ett toxin, som påverkar växtens metabolism och orsakar krusighet i bladen och hämmar rottillväxten (Markkula m. fl. 1976, Nehlin m. fl. 1994). Markkula m. fl. (1976) påpekade även att när det gäller unga morotsplantor kan redan en bladloppa orsaka total skördeförlust. Nissinen m. fl. (2007) undersökte samverkan mellan värdväxtens ålder och tidslängden för ätandet och konstaterade att skördeförlusten är signifikant redan då en bladloppa äter i tre dygn på en morotsplanta i hjärtbladsstadiet.

### 1.2.3 CLso morfologi och systemisk infektion av värdväxten

CLso är en stavformad, cirka 0,2 µm bred och 4 µm lång bakterie (Liefting m. fl. 2009a). Nissinen m. fl. (2014) undersökte bakterien i svepelektronmikroskop (SEM) och beskrev cellerna som ”långa, tunna, flexibla stavar med avsmalnande ändar och en tvärgående, böljande yta, kännetecknen som gör cellens morfologi påfallande masklik” (Nissinen m. fl. 2014, översättning av skribenten, s. 816). Forskarna förklarar att med hjälp av bilderna från transmissionselektronmikroskop (TEM) får man en uppfattning hur bakterien rör sig med växtsaften, som flödar i floemet, men i de silceller som kollapsar där lyserar även bakterien, vilket kan förklara att CLso kan inte överleva utan en levande värd (Nissinen m. fl. 2014). CLso genom har reducerats både i storlek och i geninnehåll som en följd av den parasitiska livsstilen (Wang, J. m. fl. 2017). Eftersom CLso saknar gener för flera olika biosyntesrutter, har bakterien en nedsatt förmåga att syntetisera aminosyror, vitaminer och enzymer, vilka är viktiga för frilevande bakteriers metabolism (Wang, J. m. fl. 2017).

Systemisk infektion av värdväxten sker i samma riktning som transporten i floemet (Wang, N. m. fl. 2017). Rörelsen sker främst i vertikal riktning längs silrören genom

silrörsporererna än horisontellt till närbelägna silrör (Wang, N. m. fl. 2017). I ett experiment under kontrollerade förhållanden utfört av Levy m. fl. (2011) konstaterade forskarna att spridningen av CLso från infektions stället till huvudstammen skedde inom loppet av sju dagar efter att bladloppan ätit. En snabb spridning av CLso genom floemet i potatis kan även bero på hög inokulationsnivå (Alvarado m. fl. 2012). Men diskussionen pågår fortfarande gällande hur bakterierna förflyttar sig från fotosynteskällan till de platser där fotosyntesprodukterna används samt i hurdan hastighet förflyttningen sker (Wang, N. m. fl. 2017).

#### 1.2.4 Åtta haplotyper har identifierats

På basis av enbaspolymorfi (SNP) i genregionen *rplJ/rplL* för 50S ribosomalt protein, intron regionen mellan 16S-23S rRNA och 16S rRNA (Nelson m. fl. 2011) har forskare identifierat olika haplotyper av CLso runt om i världen. Totalt har åtta olika haplotyper tills nu identifierats och de associeras till olika värdväxter. Både haplotyp A och B förekommer i norra och centrala Amerika och associeras till potatis och andra potatisväxter (Munyaneza 2012). Haplotyp A förekommer också på Nya Zeeland (Munyaneza 2012). Nyligen påvisades ytterligare en tredje haplotyp F i USA och även denna sammankopplades till potatis (Swisher Grimm och Garczynski 2019). Haplotyp C sammankopplas med morot och förekommer i Finland, Sverige, Norge och Tyskland (Munyaneza 2012, Munyaneza m. fl. 2015, Haapalainen m. fl. 2018a). Haapalainen m. fl. (2018b) skriver i en artikel att man bekräftat haplotyp C i symptomfria potatisplantor i Finland. Dessa potatisplantor, med CLso haplotyp C infekterade potatisknölar, uppvisade inte symptom av Zebra chip sjukdomen, som däremot är associerad till haplotyp A och B. Den följande generationen av potatis från de infekterade potatisplantorna var emellertid inte infekterat med CLso (Haapalainen et al. 2018b). I södra Europa och i medelhavsområdet förekommer haplotyp D och E som är associerat till selleri och morot (Teresani m. fl. 2014). Haapalainen m. fl. (2018a) sammankopplade haplotyp U i Finland till brännässla (*Urtica dioica* L.). Den allra senaste upptäckten av haplotyp G påvisades i ett herbarieexemplar av *Solanum umbelliferum* (Mauck m. fl. 2019).

### 1.2.5 Variation inom CLso haplotyper har identifierats med MLST

Multi-lokus sekvensering (MLST) används för att studera genetisk variation i bakteriearter. Med hjälp av MLST har forskare kunnat identifiera variation inom olika CLso haplotyperna, både i växter och bladloppor (Haapalainen m. fl. 2018a). I studien undersöktes sju gener (*adk*, *atpA*, *fbpA*, *ftsZ*, *glyA*, *groEL* och *gyrB*). Dessa gener valdes ut dels för att generna förekommer som enkelkopior i de sekvenserade CLso arternas genom, dels för att dessa geners genprodukt har en viktig funktion för bakteriens metabolism, dels är sekvenserna mellan 400-700 nukleotider lång. Det finns också bevis på att det förekommer ett stabiliserande urval i haplotyperna A, B, C (Haapalainen m. fl. 2018a). Haapalainen m. fl. (2018a) identifierade fyra olika sekvenstyper (ST) inom haplotyp C. I morot och i morotsbladloppan påvisades förekomst av både haplotyp C ST1 och ST2. I palsternacka, hundkäx och nattskatta (*Solanum nigrum* L.) förekom haplotyp C ST1. I hundkäx och i bladloppan *T. anthrisci* påvisades både ST3 och ST4 (Haapalainen m. fl. 2018a). I den nyupptäcka haplotyp H förekommer också variation och fyra olika sekvenstyper har identifierats (Haapalainen m. fl. 2019).

### 1.2.6 Genen *ftsZ* användbar för identifiering av olika haplotyper

FtsZ är ett väl bevarat protein, som förekommer hos de flesta bakterier och vars struktur består av fyra proteindomäner (Buske & Levin 2013). Genen *ftsZ* uppvisar mer variation än de övriga genfragmenten. *FtsZ*- och *gyrB*- genen har varit användbara för identifiering av olika bakteriepopulationer av haplotyp C (Haapalainen m. fl. 2018a) men också av haplotyp H (Haapalainen m. fl. 2019). Startsekvenserna *ftsZ-F* och *ftsZ-R* designades för den C-terminala ändan (Haapalainen m. fl. 2018a). Den C-terminala ändan av *ftsZ*-genen är mer varierande jämfört med N-terminala ändan (Buske & Levin 2013). På så sätt kan vanligt förekommande jordbakterier, såsom *Rhizobium* arter uteslutas, ytterligare är genprodukten av *ftsZ* ett för metabolismen nödvändigt protein i proteobakteriernas celledelning och är därför användbar i MLST schemat (Minna Haapalainen, Helsingfors universitet, skriftlig information, 12.11.2019). För det andra förekommer det hos alfaproteobakterier en exceptionellt lång C-terminal ända med cirka 119-330 aminosyror av vars orsak övriga bakterier kan uteslutas då startsekvenserna inte vid PCR binder till DNA (Buske & Levin 2013).

### 1.2.7 Bladmissfärgningar associeras med CLso

Synliga symptom i potatisens bladverk, som sammankopplats med CLso infektion är kloros, uppsvällda internoder, dvärgtillväxt och förökning av axillära knoppar och luftknölar (Munyaneza m. fl. 2007). Alvarado m. fl. (2012) undersökte i kontrollerade förhållanden potatisplantornas reaktion på bladloppor, vars nivå av CLso titer varierade samt med exponeringstiden, det vill säga hur länge växten var utsatt för bladloppan. Forskningen påvisade en korrelation mellan CLso titer i potatisbladloppan och svårhetsgraden av symptom i växten och forskarna drog slutsatsen att mängden CLso titer vid inokulation är en viktig faktor för hur sjukdom symptomen utvecklas i potatisplantan. (Alvarado m. fl. 2012).

Symptom i morot, som förknippas med CLso, är missfärgning av bladen i purpur, gult och brons (Bild 1), vilket korrelerar med en hög bakterielltiter (Nissinen m. fl. 2014, Haapalainen m. fl. 2017), men motsvarande symptom kan också orsakas av fytoplasma infektion (Nissinen m. fl. 2014). Symptom som associeras till bladloppan är bladkrusighet, rothårighet och minskad rottillväxt (Munyaneza 2012, Haapalainen m. fl. 2017). Rothårighet är däremot inte en följd av CLso haplotyp C infektion (Haapalainen m. fl. 2017), men en varm och torr sommar kan möjligtvis öka symptomen (Minna Haapalainen, Helsingfors universitet, skriftlig information, 14.5.2019). I spansk selleri observerades år 2008 symptom såsom gulnande, förökning av skott och vridning av stjälken, som liknar symptomen för fytoplasma infektion (Teresani m. fl. 2014).

### 1.2.8 Oklart ännu hur CLso bakterien sprids mellan olika växtarter

I en studie av Haapalainen m. fl. (2018b) bekräftades CLso i potatis, som odlades bredvid morotsfält, men forskarna fick inte svar på frågan hur potatisen hade infekterats. CLso bekräftades också i palsternackor från Egentliga Tavastland (Haapalainen m. fl. 2018a). Både palsternacka och potatis förekommer i växtföljden för morot, eftersom sandjordar lämpar sig för alla dessa tre odlingsväxter. Asko Hannukkala (LUKE, skriftlig information, 28.12.2018) bekräftar att några morotsodlare, som varit med i Naturresursinstitutets projekt har palsternacka med i växtföljden för morot och på några gårdar i Satakunda förekommer även potatisen med i växtföljden för morot. Teresani m. fl. (2014) menar att närbelägna CLso infekterade morötter och förekomst av populationer

av bladloppan *B. trigonica*, men även andra okända populationer av bladloppan, kan vara orsak till att sjukdomen uppkommit även i selleri i Spanien.

Spridning av CLso kan ske både horisontalt och vertikalt med bladloppan *Bactericera cockerelli* Šulc, *B. trigonica* Hodkinson, *Trioza apicalis* Förster och andra *Trioza* spp. arter (Munyanza 2012, Teresani m. fl. 2014). Den vertikala spridningen, då en infekterad insekt överför bakterien till sin avkomma, kan upprätthålla bakteriepopulationen under bladloppans vilostadium och sprida bakterien mellan geografiska regioner (Munyanza 2012).

Det är svårt att utmärka på hur stort område bladlopporna rör sig. De kan med vinden förflytta sig rätt långt från sin värdväxt (Gertsson 2010). Men även sjöar och skogar begränsar spridningen (Haapalainen m. fl. 2017). Enligt Kristoffersen m. fl. (2007) kan bladloppan röra sig på ett område cirka en kilometer från morotsfältet till närmaste granskog. Största sannolikheten för en förflyttning omfattar ett område på cirka 250 meter från morotsfältet (Kristoffersen m. fl. 2007). Enligt finländsk forskning kan morotsbladloppan söka upp en lämplig föröknings- och födoplatz till och med fem kilometer från dess övervintringsplat, men däremot behöver bladloppan finna sin övervintringsplat på cirka 200 meter från morotsfältet (Anne Nissinen, Luke, 2019 REVI-projektets seminarium 2.4.2019).



Bild 1. Symptom av '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (CLso). A. Missfärgning i gult och brons i palsternacka. B. Symptom av CLso i morot. Missfärgning i purpur, gult och brons. C-D. CLso symptom i pilört. Grannröd och gul missfärgning med början från bladkanten.

## 2 STUDIENS MÅLSÄTTNING

Målet med denna studie är att undersöka CLso bakteriens förekomst och genetiska mångfald i Satakunda, Egentliga Finland och Savolax från palsternacka- och morotsodlingar där bladmissfärgningar och morotsbladloppor har upptäckts. Studiens andra målsättning är att undersöka CLso bakteriens förekomst och genetiska mångfald i vilda växter, som växer på skiften där morot och palsternacka odlas och uppvisar liknande symptom på missfärgningar i bladen som moroten. Analyserna görs med realtids-PCR. Bakteriesekvenserna från de olika proven jämförs med varandra och med tidigare sekvenserade prov. Bakteriens förekomst och genotyp jämförs mellan morot och palsternacka samt mellan de olika provpartierna och mellan landskapen.

Examensarbets hypoteser är följande:

1. Palsternacka kan smittas med CLso då morot, som har infekterats med haplotyp C, odlas på närbelägna skiften.
2. Fördelningen av CLso templat / ng total DNA är likadan i både morot och palsternacka och mellan områdena Satakunda och Södra Savolax.
3. CLso infektion minskar palsternackans rotvikt i förhållande till blastvikten i Satakunda.

## 3 MATERIAL OCH METODER

### 3.1 Insamling av växtprov

För analysering och detektering av '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (CLso) i morot och palsternacka insamlades växtprov av morot och palsternacka från totalt 13 producenter i Satakunda, Egentliga Finland och Södra Savolax. Palsternacka insamlades från fem odlingsskiften i Satakunda och tre odlingsskiften i Södra Savolax. Morot insamlades från sex odlingsskiften i Satakunda, två i Egentliga Finland och tio odlingsskiften i Södra Savolax. Växtproven från Södra Savolax insamlades av Livsmedelsverkets granskare (Heikki Häkkinen, NTM-centralen) och växtproven från Egentliga Finland och Satakunda insamlades av skribenten med hjälp av ProAgrias trädgårdsrådgivare (Marja Tuononen, ProAgria Västra-Finland). Från Satakunda



insamlades ytterligare från två odlingsskiften fyra vilda växter av familjen Polygonaceae. Växterna uppvisade liknande symptom som morötterna och palsternackorna. Efter insamlingen utvärderades växtproven enligt antalet missfärgade blad och färg, antalet döda blad, förekomst av bladloppor eller nymfer samt bladkrusighet, rot- och blastvikt, sidoskott, rothårighet och därtill noterades övriga avvikande skador. Totala antalet utvärderade växtprov var 151 morötter och 65 palsternackor samt tre pilörter och en åkerbinda.

### 3.2 DNA extrahering

För DNA extrahering urvaldes totalt 97 morötter, 65 palsternackor och de fyra vilda växterna. Palsternackans rot och blast preparerades skilt var för sig. Alla insamlade och utvärderade morötter analyserades inte. Urvalet baserade sig dels på odlingsskiftets läge till palsternackaskiften, dels på den visuella utvärderingen av proven på basis av antecknade symptom, dels på förekomsten av levande morotsbladloppor eller nymfer. 0,1 g av varje prov av morot bladskaff, palsternacka rotända och palsternacka bladskaff skars i små bitar och överfördes till respektive 1,5 mL eppendorf rör. Av de vilda växterna skars 0,1 g av stammen i små bitar och överfördes till 1,5 mL eppendorf rör. Proven lades i frysen i -20 °C i väntan på vidarebehandling. Växtmaterialet överfördes sedan till FastPrep (MP Biomedicals) rör innehållande 400 mL lysis lösning A. Innehållet homogeniserades med FastPrep FP120 BIO101 (Thermo Savant). Sedan tillsattes 3,5 µL RnaseA och rören upphettades i värmeblock (Grant Boekel Metzler) i 65 °C i 10 minuter. Därefter utfördes DNA isoleringen enligt instruktionerna för DNeasy Plant Mini Kit (250) (QIAGEN) (Bilaga 1) från och med punkt 3 med följande modifikationer. Vid centrifugering av lysatet i FastPrep rören användes en centrifugeringshastighet på 10 000 rpm. I punkt 11 eluerades DNA två gånger med 50 µL MQ vatten, som var föruppvärmt till 65 °C. Slutligen analyserades DNA extraktet med NanodropLite spectrophotometer (Thermo Scientific) och proven lades i frysen i -20 °C.

### 3.3 PCR metoder

I denna målinriktade studie detekterades bakterien med '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' specifik startsekvens enligt realtids-PCR-metoden. För att bestämma den relativa bakterietitern i proven utfördes första realtids-PCR körningen med startsekvensen

LsoF, HLBr och HLBp (Tabell 2, Bilaga 5). Som tröskelvärde anses ett  $C_T$ -värde på 40 vara negativt (Li m. fl. 2006, Li m. fl. 2009). Ett  $C_T$ -värde mellan 37 – 40 är mycket svagt (Bilaga 5). Om  $C_T$ -värden var avvikande i två av tre parallellprov och det tredje negativt ansågs provet vara ett gränsfall och analyserades en gång till. I den andra realtids-PCR körningen användes en startsekvens-sond COXf, COXr och COXp uppsättning, som en positiv intern kontroll men också för att utvärdera kvalitén på DNA extraheringen och normalisera realtids-PCR datan för att sedan kunna bestämma kvantiteten av bakteriepopulationen i proven (Bilaga 5). Eftersom det tidigare inte hade gjorts standardkurva för palsternacka utfördes en standardserie även för palsternacka för att försäkra att realtids-PCR fungerar lika effektivt för palsternacka som för morot (Bilaga 5). Startsekvens-sond COXf, COXr och COXp baserar sig på växtens cytokromoxidas (COX) (Li m. fl. 2006, Li m. fl. 2009).

Detektion av CLso gjordes enligt protokollet för realtids-PCR där reaktionsvolymen var 20  $\mu$ L (Bilaga 3). Blandningens komponenter var 3,8  $\mu$ L nukleasfritt vatten (MQ), 0,48  $\mu$ L startsekvens LsoF och HLBr (240 nM, stamlösning 10  $\mu$ M), 0,24  $\mu$ L sond HLBp (120 nM, stamlösning 10  $\mu$ M), och 10  $\mu$ L Thermo Scientific Maxima Probe realtids-PCR Master Mix (2x), no ROX. Mastermix blandningen fördelades på realtids-PCR platta 384 med 15  $\mu$ L i varje brunn. Templatets mängd i reaktionslösningen var 5  $\mu$ L. Templatens total DNA halt varierade mellan 7,2 – 80,3 ng/ $\mu$ L (Bilaga 2). Templatet utspäddes på basis av total DNA halt för att uppnå en ungefärlig halt på 2 ng DNA i proven. Varje prov analyserades i tre parallellprov (Bilaga 3). realtids-PCR plattan centrifugerades i 2 minuter 3000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) varefter plattan övertäcktes med en optisk plastfilm. realtids-PCR körningen utfördes med LightCycler® 480 II (Roche) enligt ett program som tidigare hade använts och optimerats för detektering av CLso. Amplifieringsprogrammet inleddes med en fördenaturering i 95 °C i 10 minuter, därefter 45 amplifieringscykler med turvis denaturering 95 °C i 15 sekunder och hybridisering och förlängning i 60 °C i 60 sekunder. Sist avslutande uppehåll i 4 °C.

### 3.4 Analys av positiva prov för bestämning av haplotyp

För bestämning av haplotyp analyserades de positiva proven med standard PCR reaktion med startsekvens ftsZ-F/R. Startsekvensen är specifik för CLso (Haapalainen m. fl. 2018a). Den amplifierade sekvensens längd var 640 baspar (Tabell 2). För sekvensering

urvaldes 10 positiva prov av palsternacka, sju från Satakunda och tre från södra Savolax. Av moroten urvaldes för sekvensering åtta positiva prov från Satakunda, ett från Egentliga Finland och tre från södra Savolax. Alla fyra vilda växter sekvenserades.

Tabell 2. PCR startsekvenser och sond, som användes för amplifiering av '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (CLso) DNA och bestämning av haplotyp.

Startsekvens eller sond	Sekvens 5'→3'	Sekvens längd (bp)	Målgen	Referens
LsoF	GTCGAGCGCTTATTTTAATAGGA	78	CLso 16S	Li m. fl. 2009
HLBr	GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG	78	Liberibacter 16S	Li m. fl. 2006
HLBp <sup>a</sup>	AGACGGGTGAGTAACGCG	78	Liberibacter 16S	Li m. fl. 2006
COXf	GTATGCCACGTCGCATTCCAGA	68	Plant <i>COXI</i>	Li m. fl. 2006
COXr	GCCAAACTGCTAAGGGCATTC	68	Plant <i>COXI</i>	Li m. fl. 2006
COXp <sup>b</sup>	ATCCAGATGCTTACGCTGG	68	Plant <i>COXI</i>	Li m. fl. 2006
ftsZ-F	ATTCTTGGTGCTACATTTGATG	640	CLso <i>ftsZ</i>	Haapalainen m. fl. 2018a
ftsZ-R	AATGAGACTGACGACGTAAAA	640	CLso <i>ftsZ</i>	Haapalainen m. fl. 2018a

<sup>a</sup> 5',6-carboxy-fluorescein (FAM), 3', Black Hole Quencher (BHQ-1)

<sup>b</sup> 5', Yakima yellow, 3', Black Hole Quencher (BHQ-1)

PCR reaktionslösningens totala mängd var 50 µL och komponenterna 30,5 µL nukleasfritt vatten (MQ), 10,0 µL 5x HF buffer med MgCl<sub>2</sub>, 1 µL 10 mM dNTP mix (200 µM), 2,5 µL 10 µM startsekvens ftsZ-F respektive ftsZ-R (0,5 µM) och 0,5 µL 2 U/µL Phusion Hot start II DNA polymerase (0,02 U/µL). Templatets mängd i reaktionslösningen var 3 µL. Reaktionslösningen med startsekvensen ftsZ-F/R kördes med optimerat program. Programmet inleds med en fördenaturering i 98 °C i 30 sekunder, därefter 35 amplifieringscykler, vilka innehåller ett denatureringsskede 98 °C i 10 sekunder, hybridiseringsskede 63 °C i 30 sekunder och förlängningsskede 72 °C i 30 sekunder. Den slutliga förlängningen varade i 10 minuter i 72 °C.

PCR reaktionslösningen analyserades i 1 % agarosgel innehållande etidiumbromid 10 µL med tillsatt 2 µL av 6 X LD buffer. Som markör användes 6 µL GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder 0,5µg / µL (Thermo Scientific). Proven kördes i agarosgelen i 1 % TAE buffer lösning med en spänningskälla (Amersham Biosciences Electrophoresis Power supply EPS301), inställd med spänning och ström, 90 volt respektive 400 mA, i 40 minuter. Därefter analyserades gelen i UV-transilluminator (Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR+) (Bild 2). De prov där band saknades eller prov där dubbelband förekom analyserades på nytt (Bild 3).

### 3.5 DNA sekvensering

De prov som i PCR analysen uppvisade band vid cirka 640 baspar renades enligt instruktionerna för QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) (Bilaga 4) och DNA koncentrationen mättes med NanodropLite spectrophotometer (Thermo Scientific). DNA fragmenten skickades till Institute for Molecular Medicine Finland laboratoriet för sekvensering.

### 3.6 Fylogenetisk analys

Den fylogenetiska analysen gjordes på basis av *ftsZ-F* produkt. Sekvenserna jämfördes med nukleotid sekvenser i GenBank databasen och justerades med programmet GeneStudio Pro version 2.2.0.0. Ett släktträd genererades på basis av de justerade sekvenserna med programmet MEGA X version 10.0.5 (Kumar m. fl. 2018). Den evolutionära utvecklingen härleds genom den Maximala sannolikhets metoden och Tamura-Nei modellen (Tamura & Nei 1993). Trädet med den högsta log sannolikheten (-1632.05) visas. För den heuristiska sökningen erhöles trädets början automatiskt genom att tillämpa Neighbor-Join och BioNJ algoritmer till en matris av parvisa uppskattade avstånd med användning av Maximum Composite Likelihood (MCL) tillvägagångssättet och sedan genom att välja topologi med bästa log värde för sannolikhet. Trädet är ritat i skala med gren längder mätt i antalet substitutioner per plats. Denna analys omfattade 37 nukleotid sekvenser. Kodon positionerna, som inkluderades, var 1:a+2:a+3:e. Det fanns totalt 567 positioner i den slutliga datauppsättningen. Evolutionära analyser utfördes med MEGA X (Kumar m. fl. 2018).

Trädet rotades genom att använda den korresponderade *ftsZ*-F sekvensen från den japanska '*Ca. L. asiaticus*' Ishi-1 stammen [GenBank anslutningsnummer AP014595.1] och CLas\_psy62 [GenBank anslutningsnummer CP001677.5], som utomstående grupp. Den fylogenetiska analysen utfördes genom att skapa släktskapet mellan de sekvenserade CLso bakteriestammarna och CLso bakteriestammarna från olika regioner i världen: haplotyp A från Nya Zeeland (JMTK01000002.1), haplotyp B från Amerika (NC\_014774.1), haplotyp C (MG705069.1 bakteriestam 15-P24a / *T. apicalis* ), (MG705053.1 bakteriestam 13-12), (MG705050.1 bakteriestam 15-214 / *T. anthrisci*), (MG705063.1 bakteriestam 15-167), haplotyp D från Israel (PKRU00000000.2), haplotyp D (MG705047.1 bakteriestam 16-004 *D. carota* seeds), haplotyp U från Finland (MG705034.1 bakteriestam 15-108 *T. urticae*), och haplotyp G från Amerika (SAMN10841479 Herbarium\_51), (SAMN10841482 Herbarium\_61).

### 3.7 Statistisk analys

För den statistiska analysen av materialet användes programmen RStudio (version 3.5.1) och Excel. Studiens ena målsättning var att undersöka bakteriens fördelning i morot och palsternacka i Satakunda, Egentliga Finland och Södra Savolax. Eftersom antalet prov från Egentliga Finland endast riktade sig till en odling uteslöt området från den statistiska analysen. Analysen av fördelningen av CLso i palsternacka och morot mellan Satakunda och Södra Savolax analyserades med både Pearsons  $\chi^2$  test, som är lämpligt för data med 1 - 2 grupper (område + art) med kvalitativa variabler (CLso +/-) och med Fischer's exakta test, eftersom det i kontingenstabellen förekom värden under 5. För att grafiskt framställa fördelningen av de CLso positiva proven för både morot och palsternacka blast i både Södra Savolax och Satakunda, ritades stapeldiagram.

$C_T$ -värden användes för att uppskatta mängden bakterier i proven. CLso templat / ng total DNA uträknades med hjälp av plasmidstandardkurvan enligt följande formel:

- 1)  $\text{LogTemp} = (C_T - 39,161)/b$ , där  $b = -3,3878$  och  $C_T = \text{medeltalet av de tre parallellprovenas } C_p\text{-värde}$ .
- 2)  $\text{Templat} = 10^{(\text{Logtemp})}$

3) *DNA (ng) i reaktion = ursprungliga provets DNA koncentration (ng/μL) mätt med NanodropLite spectrophotometer (Thermo Scientific) \* 1/provets utspädning (Bilaga 2) \* 5 μL*

4) *Templat / ng total DNA = Templat / ng DNA i reaktion*

Templatets antal uträknades utgående från en plasmidstandardkurva, som utförts i ett tidigare försök och som grundade sig på en utspädningsserie av en plasmid i vilken klonats en kopia av rRNA-operonet från CLso haplotyp C (Wang, J. m. fl. 2017). Denna plasmidstandardkurva fungerade som referens. Plasmidpreparatets utspädningsserie var känd och dess DNA halt hade mätts med Qubit-fluorometer och templatets antal hade sedan uträknats på basis av detta.

En standardkurva för utspädningsserierna både för morot och palsternacka beräknades för att försäkra sig om att PCR fungerade (Bilaga 5). Eftersom histogrammen visade att undersökningsgrupperna inte var normalfördelade användes Mann-Whitney U test för att statistiskt testa om fördelningen av CLso templat / ng total DNA i palsternacka och morot mellan områdena Satakunda och Södra Savolax är likadana. För att analysera det linjära sambandet mellan blast- och rotvikt utfördes korrelationsanalys och linjär regressionsanalys i Excel. Palsternackaprovens rot- och blastvikt samt rot/blastviktens förhållande jämfördes med logaritmen av CLso templat / ng DNA i palsternackablasten från Satakunda, med undantag för proven 2P4, 3P13, 3P18 där blastvikten saknades. Morotsprovets rot/blastvikt förhållandet jämfördes med logaritmen av CLso templat / ng DNA i blasten från Satakunda och Egentliga Finland. Ytterligare analyserades rot/blast viktförhållandet med mängden CLso templat / ng DNA i palsternackaproven från Satakunda, som sedan analyserades med Spearmans rangkorrelationsanalys, med undantag för proven 2P4, 3P13, 3P18 där blastvikten saknades.

## 4 RESULTAT

### 4.1 Visuell utvärdering av morots- och palsternackaproven

I den visuella utvärderingen av morots- och palsternacka proven konstaterades att andelen av palsternackor med missfärgad blast var hög. Mer än 90 % av proven med någon grad av missfärgning, bekräftades som CLso positiva (Tabell 3). I morot förekom missfärgning i nästan alla undersökta prov, men endast 63 % bekräftades som CLso positiva.

Tabell 3. Förekomst av '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (CLso) i morots- och palsternackaproven enligt växt, symptom, antal analyserade växter, antal CLso<sup>+</sup>, procentuellt antal CLso<sup>+</sup> jämfört med antal analyserade växter enligt symptom kategori och procentuellt antal CLso<sup>+</sup> enligt symptom kategori jämfört med antalet CLso<sup>+</sup> i alla symptom kategorier.

Växt	Symptom	Antal analyserade växter	Antal CLso <sup>+</sup> växter	Antal CLso <sup>+</sup> / Antal analyserade växter (%)	Antal CLso <sup>+</sup> enligt symptomkategori / Totala antalet CLso <sup>+</sup> prov (%)
Palsternacka rot	Hårig rot	16	14	87,5	28,0
	Förgrenad rot	20	16	80,0	32,0
	Alla symptom kategorier	65	50	76,9	
Palsternacka blast	Bladkrusighet	3	3	100,0	5,1
	Missfärgning	61	55	90,2	93,2
	Vridna bladskäft	5	4	80,0	6,8
	Alla symptom kategorier	65	59	90,8	
Morot	Bladkrusighet	48	43	89,6	70,5
	Missfärgning	95	60	63,2	98,4
	Missfärgning och bladkrusighet	46	42	91,3	68,9
	Hårig rot	71	45	63,4	73,8
	Vridna bladskäft	22	18	81,8	29,5
	Alla symptom kategorier	97	61	62,9	

Över hälften av de utvärderade proven av både palsternacka och morotsprov med rothårighet bekräftades som CLso positiva. Men däremot förekom det rothårighet i knappt en tredjedel av alla CLso positiva palsternackaprov, medan i morot var rothårighetens andel av de CLso positiva morotsproven nästan tre fjärdedelar (Tabell 3). Lindrig bladkrusighet kunde visuellt bekräftas endast i tre prov av palsternackablasten och samtliga prov med bladkrusighet bekräftades CLso positiva (Tabell 3), men bladkrusighet förekom endast i 5 % av totala antalet undersökta palsternackaprov. I morot var bladkrusighet betydligt mer synbar och 90 % av alla proven med bladkrusighet, bekräftades även CLso positiva (Tabell 3).

## 4.2 Förekomst av CLso i morot och palsternacka

Av 97 undersökta morotsprov bekräftades 61 prov vara CLso positiva. Totala antalet undersökta palsternackablast- respektive rotprov var 65. Av blastproven bekräftades 59 prov vara CLso positiva och av rotproven bekräftades 50 prov vara CLso positiva (Bild 2). Alla undersökta morotsprov från Satakunda och Egentliga Finland bekräftades vara CLso infekterade, däremot i Södra Savolax var antalet CLso positiva prov lägre (Tabell 4). I palsternacka var den procentuella andelen CLso positiva över 80 % i samtliga skiftena med undantag för ett skifte i Södra Savolax (Tabell 4).

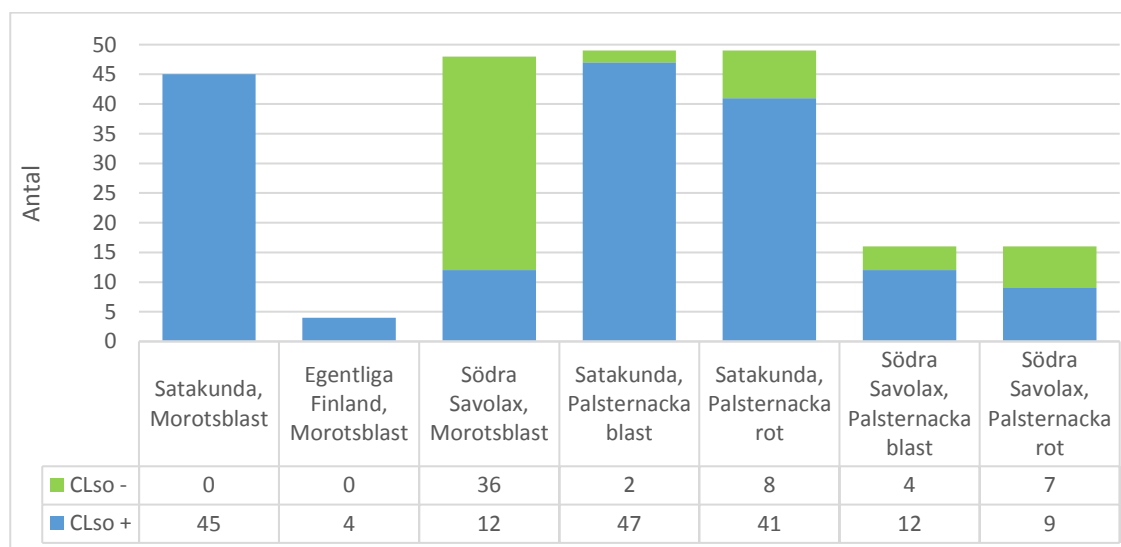


Bild 2. Fördelningen av CLso negativa och positiva prov enligt område, art och växtedel.



Fördelningen av CLso i morotsproven från Savolax jämfört med morotsproven från Satakunda korrelerade (phi-koefficient  $\Phi = 0,77$ ) och skillnaden var signifikant ( $\chi^2 = 51,95$   $p = 0,035$ ,  $p < 0,05$ , Fischer's exakta test  $p = 9,20\text{e-}16$ ,  $p < 0,001$ ). Korrelationen mellan CLso fördelningen i palsternacka blastproven mellan Södra Savolax och Satakunda var negativ (phi-koefficient  $\Phi = -0,286$ ) och enligt  $\chi^2$  -testet ( $\chi^2 = 4,05$ ,  $p < 0,05$ ) signifikant. Däremot enligt Fischer's exakta test var fördelningen av CLso mellan områdena inte signifikant ( $p = 0,056$ ,  $p > 0,05$ )

Fördelningen av CLso i morot i Savolax jämfört med palsternackablast proven i Savolax korrelerade (phi-koefficient  $\Phi = 0,45$ ) och var signifikant ( $\chi^2 = 12,80$   $p = 0,00035$ , Fischer's exakta test  $p = 0,00069$ ,  $p < 0,001$ ). Däremot var CLso fördelningen i morotsproven i Satakunda jämfört med palsternackablastproven i Satakunda svagt korrelerande (phi-koefficient  $\Phi = 0,17$ ), men inte signifikanta ( $\chi^2 = 2,43$ ,  $p = 0,119$ , Fischer's exakta test  $p = 0,207$ ,  $p > 0,05$ ).

### 4.3 Mängden CLso templat i morot och palsternacka

En av studiens hypoteser var att undersöka fördelningen av mängden bakterietemplat inom odlingsväxt och område. I CLso bakteriens DNA förekommer det tre kopior av rRNA operonet och utgående från antalet templat kan antalet CLso bakterier i proven uträknas genom att dividera mängden templat med tre (Wang, J. m. fl. 2017). I resultatet anges bakteriemängden som antal templat / ng total DNA. Fördelningen av CLso templat / ng total DNA i de undersökta proven varierade mellan art och område. I morot i Savolax var bakteriemängden mycket låg, i alla proven mindre än två templat / ng total DNA (Bild 2a). Jämfört med moroten var mängden templat i palsternacka betydligt högre, trots att hälften av proven hade en bakteriemängd mindre än 10 000 templat / ng total DNA (Bild 2b). I Satakunda i morot var bakteriemängden hög, i största delen av de positiva proven var bakteriemängden över 100 000 templat / ng total DNA (Bild 2c). Däremot i palsternackan i Satakunda var bakteriemängden i hälften av proven mindre än 10 000 templat / ng total DNA (Bild 2d). Både i palsternacka i Satakunda och Södra Savolax var mängden CLso i proven under 10 000 templat / ng total DNA.

Tabell 4. Antal undersökta prov per art, skifte, region, sort, antal analyserade prov, antal CLso<sup>+</sup> och den procentuella andelen CLso<sup>+</sup> prov.

Art	Skifte	Region	Sort	Antal analyserade växter	Antal CLso <sup>+</sup>	CLso <sup>+</sup> %
Morot ( <i>D. carota</i> )	1	Satakunda	Napa	10	10	100,0
	2	Satakunda	Napa	10	10	100,0
	3	Satakunda	Romance	11	11	100,0
	4a	Satakunda	Fontana	2	2	100,0
	4b	Satakunda	Fontana	2	2	100,0
	6	Satakunda	Romance	10	10	100,0
	5a	Egentliga Finland	Fontana	2	2	100,0
	5b	Egentliga Finland	Romance	2	2	100,0
	7	Södra Savolax	Flera olika	4	2	50,0
	8	Södra Savolax	Yukon	10	0	0,0
	9a	Södra Savolax	Yukon	5	1	20,0
	9b	Södra Savolax	Panther	9	0	0,0
	10	Södra Savolax	Napoli	9	1	11,1
	12a	Södra Savolax	Natalja	3	3	100,0
	12b	Södra Savolax	Yukon	2	1	50,0
	12c	Södra Savolax	Yukon	1	0	0,0
	13a	Södra Savolax	Natalja	2	1	50,0
	13b	Södra Savolax	Maestro	3	3	100,0
Palsternacka ( <i>Pastinaca sativa</i> )	1	Satakunda	Palace	10	10	100,0
	2	Satakunda	Palace	10	10	100,0
	3a	Satakunda	Pacific	10	10	100,0
	3b	Satakunda	Palace	9	8	88,9
	6	Satakunda	Palace	10	9	90,0
	9	Södra Savolax	Javelin	6	3	50,0
	11a	Södra Savolax	NA	5	4	80,0
	11b	Södra Savolax	NA	5	5	100,0
Pilört ( <i>Persicaria lapathifolia</i> )	3	Satakunda		3	3	100,0
Åkerbinda ( <i>Fallopia convolvulus</i> )	4a	Satakunda		1	1	100,0
Totala antalet analyserade växter				166	124	74,7

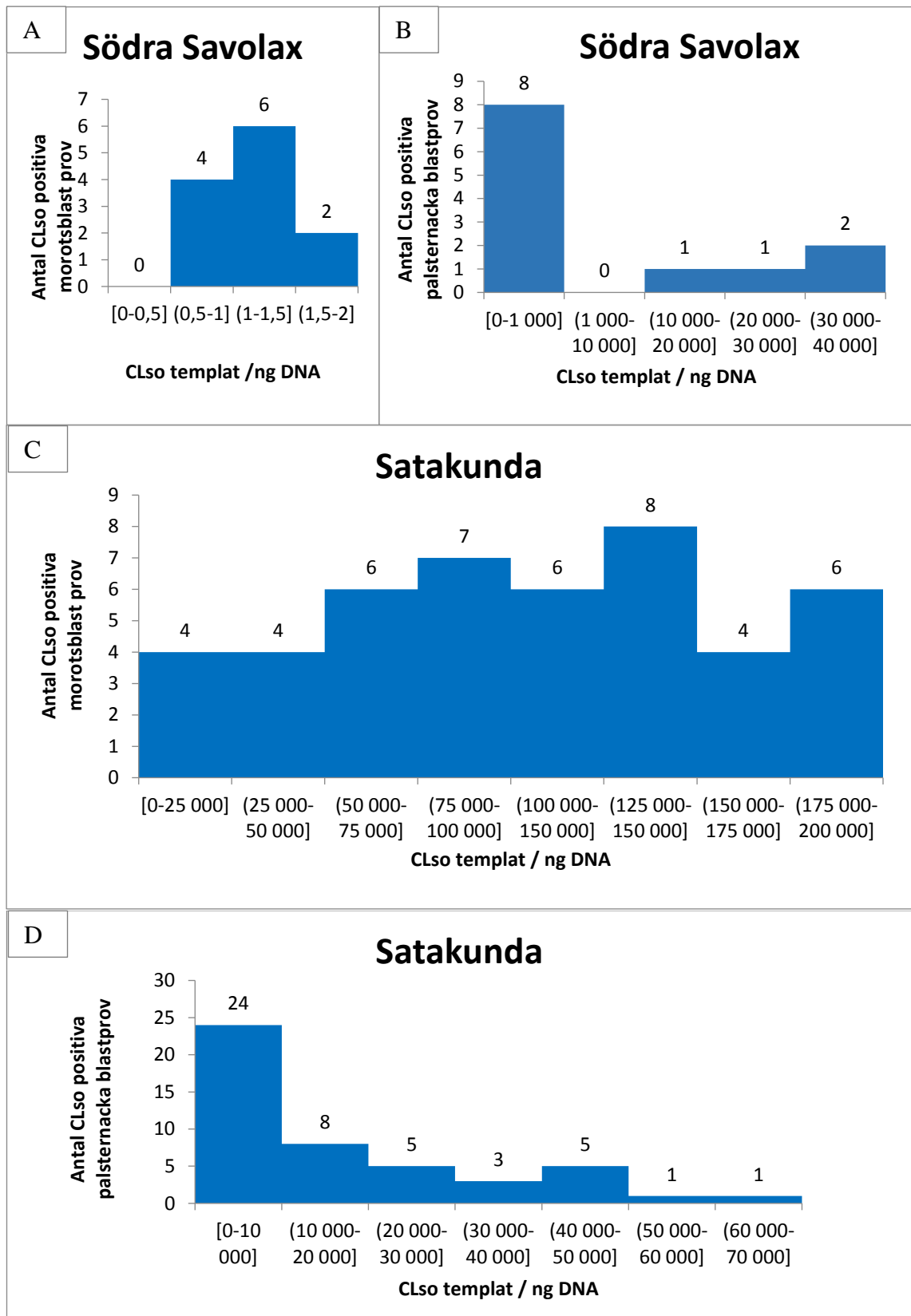


Bild 3. Histogram som beskriver fördelningen av CLso templat / ng total DNA i CLso positiva prov A. Morotsproven från Södra Savolax B. Palsternacka blastproven från Södra Savolax. C. Morotsproven från Satakunda D. Palsternacka blastproven från Satakunda.

En signifikant skillnad förekom i mängden templat / ng i morot i Satakunda och palsternacka i Södra Savolax ( $W=520$ ,  $N_1 = 45$ ,  $N_2 = 12$ ,  $p = 7,335e-09$  två-sidig), palsternacka i Satakunda ( $W=1988$ ,  $N_1 = 45$ ,  $N_2 = 47$ ,  $p < 2,2e-16$  två-sidig), morot i Södra Savolax ( $W=540$ ,  $N_1 = 45$ ,  $N_2 = 12$ ,  $p = 2,828e-12$  två-sidig) (Bild 4). Däremot var skillnaden inte signifikant i mängden CLso templat / ng DNA i palsternacka i Södra Savolax jämfört med morot i Södra Savolax ( $W=91$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_2 = 12$ ,  $p = 0,291$  två-sidig) eller jämfört med palsternacka i Satakunda ( $W=195$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_2 = 47$ ,  $p = 0,104$  två-sidig) (Bild 4). Däremot var det en signifikant skillnad mellan mängden CLso templat / ng i morot i Södra Savolax jämfört med palsternacka i Satakunda ( $W=70,5$ ,  $N_1 = 12$ ,  $N_2 = 47$ ,  $p = 7,09e-05$  två-sidig) (Bild 4).

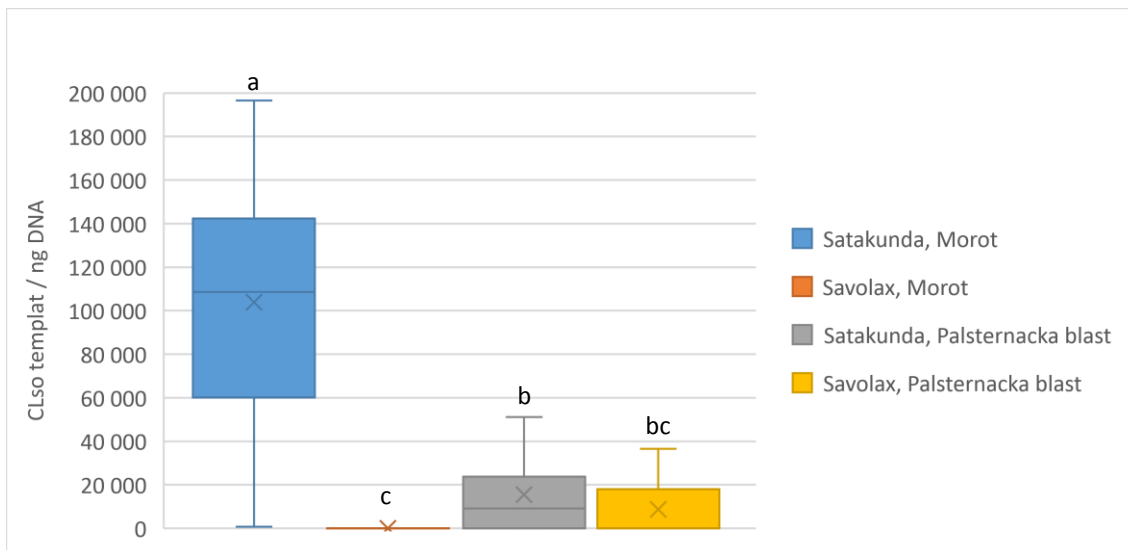


Bild 4. Mängden CLso templat / ng (total) DNA i morots- och palsternacka blastproven från Satakunda och Södra Savolax. Det vågräta strecket i boxen utmärker fördelningens median och medeltalet är markerat med ett kryss. Medianen för CLso templat / ng total DNA i morot i Satakunda avvek signifikant jämfört med CLso templat / ng total DNA i morot Södra Savolax ( $P$ -värdet =  $2.828e-12$ ), i palsternacka i Satakunda ( $P$ -värdet  $< 2.2e-16$ ) och palsternacka i Södra Savolax ( $P$ -värdet =  $7.335e-09$ ). Skillnaden i medianerna för CLso templat / ng total DNA i palsternacka i Södra Savolax jämfört med palsternacka i Satakunda ( $P$ -värdet =  $0.104$ ) och jämfört med morot i Södra Savolax ( $P$ -värdet =  $0.291$ ) var inte statistiskt betydande. Boxar märkta med olika bokstäver är signifikant avvikande ( $P$ -värdet  $< 0.05$ ).

#### 4.4 Korrelation mellan rot- och blastvikt samt rot/blastvikt förhållandet och mängden CLso templat / ng DNA

##### 4.4.1 Korrelation mellan rot- och blastvikt

Korrelationen mellan morotens rot- och blastvikt från Satakunda och Egentliga Finland var positiv (korrelationskoefficient 0,661) och sambandet mellan rot- och blastvikten var signifikant (linjär regressionskoefficient = 0,267,  $R^2 = 0,4378$ ,  $F = 36,61 > F_{0,99} [1,47] = 7,27$ ,  $p < 0,001$ ) (Bild 5a). I Satakunda var korrelationen mellan palsternackans rot- och blastvikt positiv (korrelationskoefficient 0,915) och sambandet mellan rot- och blastvikt var signifikant (linjär regressionskoefficient = 0,742,  $R^2 = 0,8366$ ,  $F = 225,31 > F_{0,99} [1,44] = 7,38$ ,  $p < 0,001$ ) (Bild 5b).

##### 4.4.2 Korrelation mellan rot/blastvikt förhållandet och CLso templat / ng DNA

Korrelationen mellan rot/blastvikt förhållandet och logaritmen av CLso templat / ng DNA i blasten i morotsproven från Satakunda och Egentliga Finland var positiv (korrelationskoefficient 0,2192), men sambandet mellan variablerna var däremot inte statistiskt signifikant (linjär regressionskoefficient = 0,215,  $R^2 = 0,0481$ ,  $p = 0,130$ ) (Bild 5c).

Korrelationen mellan rot/blastvikt förhållandet och logaritmen av CLso templat / ng DNA i blasten i palsternackaproven från Satakunda var svagt negativ (korrelationskoefficient -0,1806) och sambandet var inte signifikant (linjär regressionskoefficient = -0,0094  $R^2 = 0,0326$ ,  $p = 0,2297$ ) (Bild 5d). Resultatet av analysen utfört med Spearmans rangkorrelationsanalys av palsternackaprovens rot/blastvikt förhållandet och mängden CLso templat / ng total DNA i blast var inte statistiskt signifikant (rangkorrelationskoefficient -0,193,  $p = 0,199$ ).

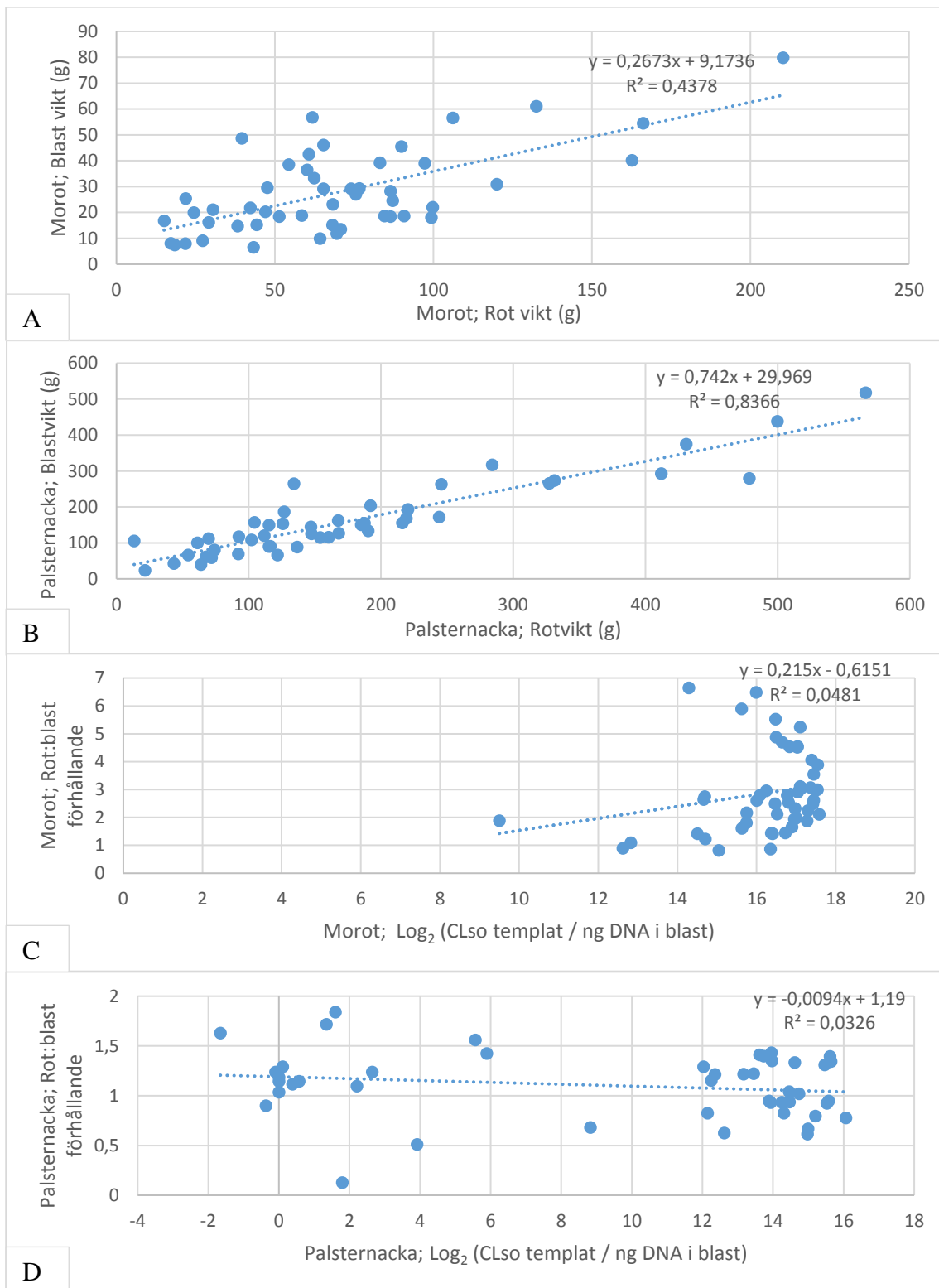


Bild 5. Korrelationen mellan rot och blast i morot och palsternacka från Satakunda och Egentliga Finland A) endast CLso positiva prov av morot B) i samtliga palsternackaprov från Satakunda, med undantag för proven 2P4, 3P13, 3P18 där blastvikten saknas. Linjär regression av rot/blast förhållandet och logaritmen av CLso templat / ng DNA i C) positiva prov av morotsblast D) i samtliga palsternackaprov från Satakunda, med undantag för proven 2P4, 3P13, 3P18, vars blastvikt saknas.

#### 4.4.3 Rot- och blastvikt i förhållande till CLso templat /ng DNA

Morotens rotvikt i förhållande till logaritmen av CLso templat / ng DNA i morotsblasten uppvisade en svagt positiv korrelation (korrelationskoefficient 0,0617) och sambandet mellan variablerna var inte signifikant (linjär regressionskoefficient = 1,631,  $R^2 = 0,0038$ ,  $p = 0,674$ ) (Bild 6A).

Korrelationen mellan palsternackans rotvikt och logaritmen av CLso templat / ng DNA i roten var negativ (korrelationskoefficient -0,1769) och sambandet mellan variablerna var inte signifikant (linjär regressionskoefficient = -3,8215,  $R^2 = 0,0313$ ,  $p = 0,225$ ) (Bild 6B). Korrelationen mellan palsternackans rotvikt och logaritmen av CLso templat / ng DNA i blasten var negativ (korrelationskoefficient -0,15) och sambandet mellan variablerna var inte signifikant (linjär regressionskoefficient = -2,946,  $R^2 = 0,0225$ ,  $p = 0,304$ ) (Bild 6C).

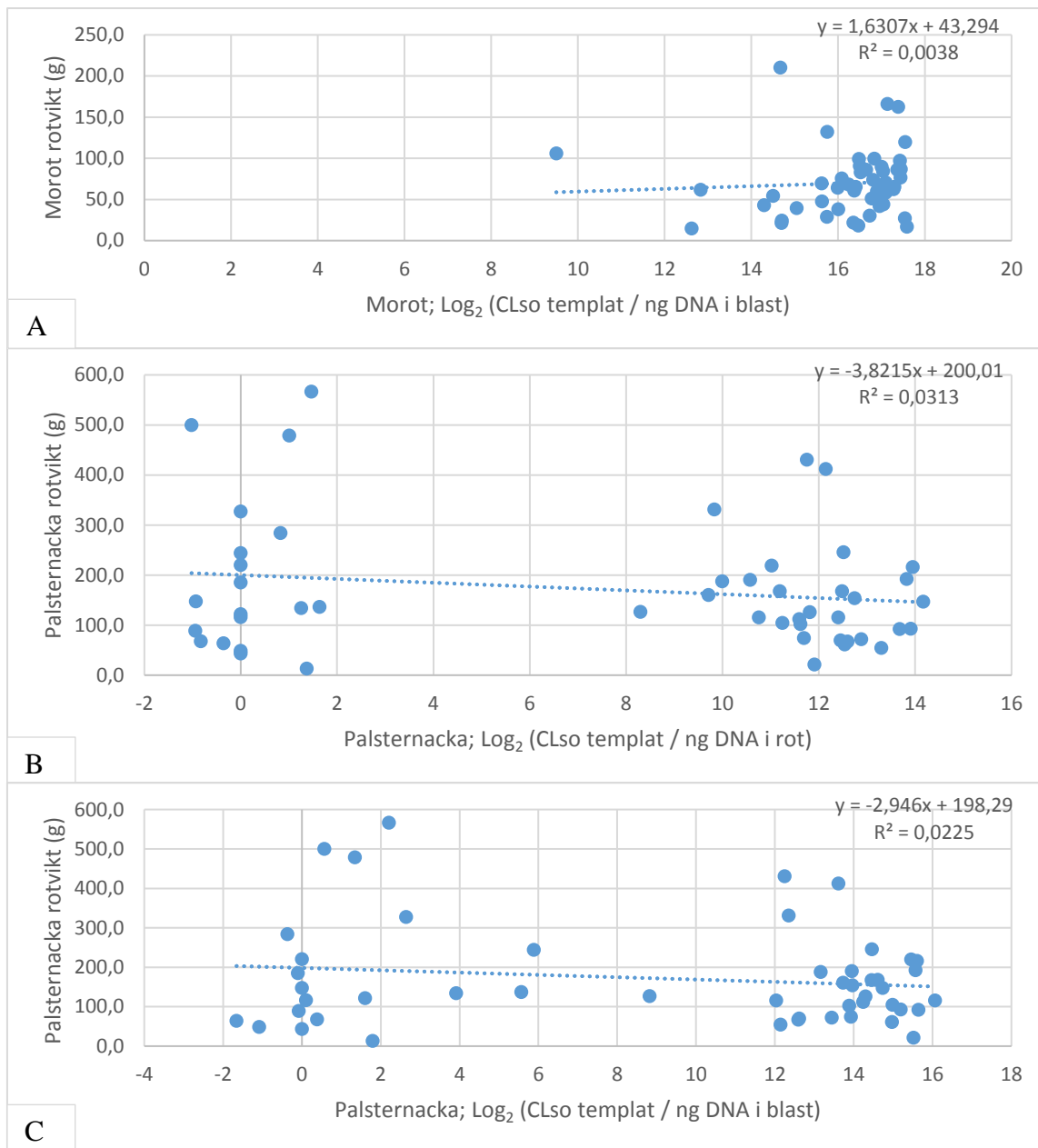


Bild 6. Korrelation och linjär regression mellan rotvikt och CLso templat / ng DNA i morotsblast respektive palsternacka rot och blast A) endast CLso positiva prov av morot från Satakunda och Egentliga Finland B) i samtliga palsternackaprov från Satakunda, rotvikt jämfört med logaritmen av CLso templat / ng DNA i roten C) i samtliga palsternackaprov från Satakunda, rotvikt jämfört med logaritmen av CLso templat / ng DNA i blasten.



#### 4.5 Identifiering av amplifierade DNA fragment

Av de positiva morots- och palsternackaproven valdes 23 prov ut för sekvensering. Sekvenserna för genområdet 50S rRNA *rplJ/rplL* och *ftsZ* genområde amplifierades med konventionell PCR metod. Eftersom mängden ng DNA /  $\mu\text{L}$  varierade i proven späddes de ut enligt Bilaga 2. Fem prov gav inget resultat i första amplifieringen (Bild 7A) och dessa prov amplifierades ytterligare en gång utan att spädas ut (Bild 7B). Totalt 22 prov gav en 640 bp PCR produkt med startsekvenserna *ftsZ*-R/F.

Resultatet från sekvenseringen av genfragmenten visade att i morot, palsternacka, pilört och åkerbinda förekom haplotyp C. Ytterligare påvisades en ny haplotyp i samtliga tre palsternackaprov från fält nummer 11 (P1L, P3L, P7L) och i pilörterna (T1, T2). Den nya haplotypen har tilldelats namnet haplotyp H (Haapalainen m. fl. 2019).

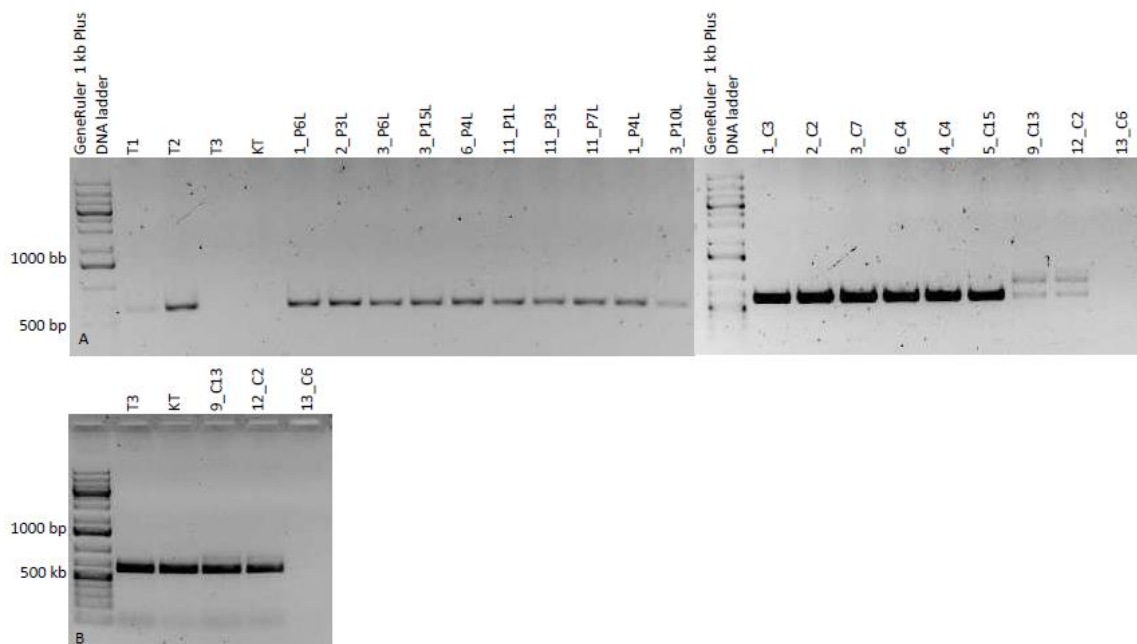


Bild 7. PCR analyser i agaros gel. A. Första PCR analysen av amplifierade PCR prov med startsekvens *ftsZ*-F/R. I alla prov förutom T3, KT, 13\_C6 hade den 640 kb sekvensen amplifierats. B. Andra PCR analysen med primer *ftsZ*-F/R. För att höja mängden templat i provet gjordes ingen utspädning av proven. I alla prov förutom 13\_C6 hade den 640 kb sekvensen amplifierats.

#### 4.6 Förekomst av CLso i vilda växter

Alla fyra vilda växterna uppvisade symptom på missfärgning i bladen (Bild 1C, 1D, Bild 8) och alla fyra proven bekräftades vara CLso infekterade. I sekvenseringen bekräftades två av pilörterna (H\_18\_T1 och H\_18\_T2) vara infekterade med haplotyp H, medan åkerbindan och den tredje pilörten var infekterad av haplotyp C sekvenstyp (ST) 1 (H\_18\_KT och H\_18\_T3). Morötterna, som växte på samma fält som åkerbindan bekräftades vara infekterade med samma haplotyp C av ST 1 (Haapalainen m. fl. 2019). Från det palsternackafält där pilörterna insamlades från, bekräftades två av pilörterna vara infekterade med haplotyp H (H\_18\_T1 och H\_18\_T2) och en pilört (H\_18\_T3) och palsternackorna infekterade med haplotyp C ST 1 (H\_18\_3P15L). Mängden bakterietemplat i de vilda växterna var betydligt högre i de prov som var infekterade med haplotyp H jämfört med de prov som var infekterade med haplotyp C (Tabell 5).

I den visuella undersökningen av de vilda växterna upptäcktes varken bladloppor eller några andra insekter. I den visuella undersökningen av bladen konstaterades att missfärgningen i bladen förekom i bladkanterna (Bild 1C, 1D och 8). Pilörterna, som var infekterade med haplotyp H uppvisade en tydligare grannröd missfärgning i bladen. Pilörten, som bekräftades vara infekterad med haplotyp C, hade mer rödgul missfärgning i bladen (Bild 1D). Åkerbindan hade en röd missfärgning i bladen (Bild 8).

Tabell 5. Realtids-PCR C<sub>T</sub>-värde för CLso, mängd CLso templat / ng DNA, bekräftad haplotyp och insamlingsplats.

Prov	C <sub>T</sub> -värde	Templat / ng DNA	Haplotyp	Fält
T1	27,02	1205	H	3
T2	21,92	25287	H	3
T3	35,76	2	C ST 1	3
KT	32,87	19	C ST 1	4a



Bild 8. Symptom av '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (CLso). Åkerbindans blad var kraftigt missfärgade i rött.

#### 4.7 Fylogenetisk analys

I tre palsternackaprov från två fält i Södra Savolax, med ett avstånd på sju km från varandra, och från ett palsternackafält i Satakunda i två vilda växter, pilört (*Persicaria lapathifolia* (L.) Gray) identifierades en ny haplotyp av CLso, som i detta arbete har namngetts till haplotyp H. Haplotyp H skiljer sig från tidigare identifierade haplotyper på flera ställen i gensekvensen *ftsZ* (Tabell 6). Utgående från det fylogenetiska släktträdet (Bild 9) kan ses att utvecklingen har gått isär i ett tidigt skede från den gemensamma förfadern (Haapalainen m. fl. 2019). Det förekommer SNP på flera ställen i gensekvensen *ftsZ* mellan haplotyp H och haplotyp C, men det bör nämnas att i nukleotidpositionen 84-86 har det skett en insertion av en kodon (GAT) som kodar för aminosyran asparaginsyra. Denna kodon saknas i de övriga haplotyperna samt även i '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (AP014595.1). Det förekommer också två olika sekvenstyper av den nya haplotyp H. I polymorfa nukleotidpositionen 252 förekommer både G respektive T. Nukleotidförändringen ger samtidigt upphov till en förändring av aminosyrasekvensen från asparaginsyra (GAT) till tyrosin (TAT) (Bilaga 7, Bilaga 8).



Bild 9. Det fylogenetiska trädet visar den evolutionära historien med hjälp av Maximum Likelihood metoden och omfattar gensekvensen *ftsZ* från 'Candidatus Liberibacter solanacearum' i olika geografiska områden. Den fylogenetiska analysen utfördes genom att skapa släktskapet mellan de år 2018 sekvenserade CLso bakteriestammarna och CLso bakteriestammarna haplotyp A från Nya Zeeland (JMTK01000002.1), haplotyp B från Amerika (NC\_014774.1), haplotyp C (MG705069.1 bakteriestam 15-P24a / *T. apicalis*),

(MG705053.1 bakteriestam 13-12), (MG705050.1 bakteriestam 15-214 / *T. anthrisci*), (MG705063.1 bakteriestam 15-167), haplotyp D från Israel (PKRU00000000.2), haplotyp D (MG705047.1 bakteriestam 16-004 *D. carota* seeds), haplotyp U från Finland (MG705034.1 bakteriestam 15-108 *T. urticae*), och haplotyp G från Amerika (SAMN10841479 Herbarium\_51), (SAMN10841482 Herbarium\_61). Som utomstående grupper användes '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Ishi-1 [GenBank anslutningsnummer AP014595.1] och '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Psy62 [GenBank anslutningsnummer CP001677.5]. Trädet är ritat i skala med grenlängder som mätts i antalet substitutioner per plats. Analysen innehåller 37 nukleotid sekvenser. Kodon positionerna som inkluderades var 1:a+2:a+3:e+Icke-kodad. Det fanns totalt 567 positioner i den slutliga datauppsättningen.

Tabell 6. Jämförelse av polymorfiska positioner i gensekvensen *ftsZ* för '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'<sup>a</sup>

Gen region	Nukleotid position <sup>b</sup>	'Candidatus Liberibacter solanacearum' haplotyp						
		A	B	C	D	G	H	U
<i>ftsZ</i>	64	G	G	G	G	G	A	G
	84-86	-	-	-	-	-	GAT	-
	92	C	C	C	C	C	A	C
	112	A	A	A	A	G	C	A
	114	C	C	C	C	A	T	C
	121	C	A	C	C	A	A	C
	223	A	A	A	A	G	A	A
	252	G	G	G	G	G	T/G	G
	275	A	A	A	A	A	G	A
	281	G	G	G/T	G	G	A	G
	284	G	G	A	T	T	A	G
	348	A	A	A	A	A	C	A
	353	A	A	A	A	A	G	A
	372	C	C	C	C	C	T	C
	416	G	G	G	G	G	A	G
	433	G	G	G	G	G	A	G
	454	G	G	G	G	G	T	G
	464	G	G	G	G	A/G	A	G
	571	A	A	A	A	A	G	A

<sup>a</sup> Den nya haplotyp H jämfördes med de för tillfället kända haplotyperna A, B, C, D, G och U.

<sup>b</sup> Nukleotidpositionen i sekvensen för haplotyp C MG705069.1\_15-P24a med början från AGGCTCTTGAAGGCGT (Bilaga 6, Bilaga 7).

## 5 DISKUSSION

För att studera förekomsten av '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' i morot och palsternacka utfördes en målinriktad studie där insamlingen av proven begränsades till växter med tydliga symptom, såsom bladkrusighet, bladmissfärgningar, vridna bladskäft eller förekomst av bladloppor. Dessa symptom har i tidigare forskning påvisats ha samband med CLso infektion (Nissinen m. fl. 2014, Teresani m. fl. 2014, Alfaro-Fernández m. fl. 2017). Studiens mål var att undersöka bakteriens förekomst och genetiska mångfald i Satakunda, Egentliga Finland och Savolax från sådana palsternacka-

och morotsodlingar där bladmissfärgningar och morotsbladloppor har upptäckts. Studiens andra målsättning var att undersöka CLso bakteriens förekomst och genetiska mångfald i pilört och åkerbinda, som växer på skiften där morot och palsternacka odlas och som uppvisar liknande symptom på missfärgningar i bladen som moroten. Både pilört och åkerbinda hör till familjen Polygonaceae.

## 5.1 Förekomst av CLso i morot och palsternacka

Denna studie visar att CLso förekommer mycket allmänt i Satakunda och Egentliga Finland. Som förväntat, bekräftades CLso haplotyp C i alla morotsskiften i Satakunda. I Södra Savolax förekommer CLso däremot i en betydligt mindre frekvens jämfört med Satakunda. CLso kan konstateras vara mycket mer allmän i Satakunda och Egentliga Finland än i Södra Savolax, vilket även stämmer väl överens med tidigare studier (Haapalainen m. fl. 2017). Haapalainen m. fl. (2017) nämner att Södra Savolax regionen är avgränsad från Egentliga Tavastland med sjöar och skogar, vilket hindrar spridningen av morotsbladloppan mellan områdena, men också storleken på odlingarna påverkar förekomsten av CLso.

### 5.1.1 Bakteriemängd i morot och palsternacka

I palsternacka var förekomsten av CLso högre än förväntat, både i Satakunda och i Södra Savolax. Överraskande var också att förekomsten av CLso i palsternacka jämfört med morot i Södra Savolax var signifikant avvikande. Även mängden CLso templat / ng DNA i morot i Satakunda avvek signifikant från mängden CLso templat / ng DNA i palsternacka i både Södra Savolax och Satakunda samt i morot i Södra Savolax. Den signifikanta avvikelserna kan dels bero på att morotsbladloppans population är större i Satakunda än i Södra Savolax, dels att morotsodlingen är mer koncentrerad till Satakunda och dels beroende på odlingsskiftenas läge i förhållanden till varandra. Ju längre bort från varandra skiftena ligger och om skiftena ytterligare avgränsas med skog och sjöar är sannolikheten mindre för bladloppan att förflytta sig mellan skiftena (Haapalainen m. fl. 2017). Både svensk och finländsk forskning har visat att bladloppan har en begränsad flygförmåga (Kristoffersen m. fl. 2007, Nissinen, Luke, 2019 REVI-projektets seminarium 2.4.2019). Munyaneza (2012) påpekar att den vertikala spridningen av CLso

kan distribuera bakterien mellan geografiska regioner men en dylik migration sker tidsmässigt långsamt. Haapalainen m. fl. (2017) påpekar också att spridningen av bakterien med bladloppan kan ha skett under en längre tidsperiod. Den långsamma spridningen förklarar Mauck m. fl. (2019) med att då de olika haplotyperna varit isolerade från varandra under en lägre tidsperiod har det uppstått genetiska skillnader mellan dem både på olika kontinenter och även inom länder.

Skillnaderna i mängden templat / ng DNA kan vara beroende av i vilket skede av grödans utvecklingsstadium infektionen sker. Ju tidigare infektionen sker och om temperaturen samtidigt är gynnsam hinner bakterierna föröka sig till höga nivåer. Men om infektionen sker i ett senare har grödan eventuellt utvecklat motståndskraft. Moroten uppnår tolerans mot bladloppan i 4-bladstadiet (Nissinen, Luke, 2019 REVI-projektets seminarium 2.4.2019). Detta kan eventuellt innebära att infektion inte sker, alternativt att bakteriens multiplicering i växten är långsammare då växten är äldre vid infektion. En avsaknad av infektion kan enligt Mauck m. fl. (2019) bero på att CLso DNAt bevaras svagt i värdväxten, värdväxten är olämplig för haplotypen ifråga eller så förekommer CLso inte i det insamlade materialet.

Avsaknad eller låg infektion av CLso i värdväxten kan också bero på om det under tillväxtperioden förekommit rikligt med andra alternativa värdväxter. Mauck m. fl. (2019) undersökte herbarie exemplar av potatisbladloppans *B. cockerelli* tre värdväxt växtarter från Södra Kalifornien i Amerika, *S. umbelliferum*, *S. americanum* och *S. elaeagnifolium*. CLso infektion påvisades endast i en växtart, *S. umbelliferum*, och forskarna antar att orsaken kan bero på att *S. umbelliferum* blommar under vintermånaderna då potatisen redan skördats och när födokällorna för potatisbladloppan är begränsad söker vektorn sig till alternativa födokällor (Mauck m. fl. 2019).

De olika arterna av bladloppor är värdspecifika, vilket framgår i en svensk forskning av Gertsson (2010). Även CLso bakterien är kräsen, vilket kan vara en orsak till att olika CLso haplotyperna förökar sig med olika hastighet beroende på värdväxt, men Li m. fl. (2009) konstaterar också att odlingssäsongens längd kan påverka hur långt bakteriekoloniseringen sker i plantan. Eventuellt kan skillnaderna i mängden templat / ng DNA vara beroende av förekomsten av två olika haplotyper av CLso. Eftersom insamlingen i denna studie var kraftigt koncentrerad till växter med synliga symptom kan



det vara möjligt att insamlingen av palsternacka proven samlades in från ett område i utkanten av ett utbredningsområde för denna nya haplotyp H i flockblomstriga växter, trots att haplotyp C är mer utbredd och mer allmänt förekommande. För det andra har vektorn, som sprider haplotyp H, inte identifierats.

### 5.1.2 Odlingssäsongens temperatur

Väderleken, men också odlingsförhållanden och åtgärderna påverkar odlingsgrödornas tillväxt och kan således påverka förekomsten av CLso. Odlingssäsongen 2018 var varmare än normalt. Medeltemperaturen för åren 1981 – 2010 i S:t Karins (60°24'25"N 22°22'20"Ö) under juni, juli och augusti var 14,3, 17,2 och 15,8 °C. År 2018 var motsvarande medeltemperaturer för sommarmånaderna 0,5, 3,4 och 1,7 °C över medeltalet (Meteorologiska institutet 2018). Enligt Haapalainen m. fl. (2017) kan det varma vädret ha en positiv påverkan på förökningen av CLso bakterien. Men det bör även beaktas att CLso bakterien är känslig för höga temperaturer över 32 °C (Munyaneza 2012). Teresani m. fl. (2014) påpekar att svala somrar, då det är få dagar med temperaturer över 30 °C, befrämjar förökningen av CLso både i växten och i vektorn, eftersom i temperaturer över 30 grader minskar förekomsten av bakterien. Här i Finland är det rätt sällan som temperaturen stiger i juni över 30°C, vilket är ett rätt gynnsamt klimat för CLso bakterien.

Frön av både morot- och palsternacka gror långsamt. År 2018 pågick morotssådden i västra Finland under hela maj och in i juni (Marja Tuononen, ProAgria, skriftlig kommentar till skribenten 09.05.2019). Morotsbladloppans flygperiod, dess tid och längd, kan inverka på mängden och frekvensen av CLso, eftersom morotsplantan är mest känslig i tvåbladstadiet, men ju äldre morotsplantan är, desto mer motståndskraftig är den mot infektion (Anne Nissinen, Luke, 2019 REVI-projektets seminarium 2.4.2019). Morotsbladloppans flygperiod inleds i början av sommaren, då bladloppan flyttar från sin övervintringsplats till sin värdväxt (Valterová m. fl. 1997). De övervintrande honorna är de som gör mest skada i morot (Anne Nissinen, Luke, 2019 REVI-projektets seminarium 2.4.2019). Dessa orsaker kan vara en följd till att proven som samlades på hösten hade antingen ett mycket högt eller så väldigt lågt innehåll av CLso templat / ng total DNA. Eventuellt kan mängden CLso templat / ng total DNA vara beroende av om horisontal

spridning av bakterien eftersom den horisontella spridningen sker högst antagligen i ett senare skede än den vertikala. Den andra orsaken kan bero på värdväxtpreferenser och vilken vektor som sprider bakterien, vilket diskuterades i föregående kapitel.

### 5.1.3 Fördelning av CLso i morot och palsternacka

Den andra hypotesen hänförde sig till att proportionen av CLso infektion är lika i morot respektive palsternacka i Södra Savolax och i Satakunda. Antagandet grundar sig på att palsternackan kan bli infekterad med CLso om det på närbelägna morotsskiften har förekommit morotsbladloppor och bladmissfärgningar har observerats, men palsternackan kan uppvisa betydligt lindrigare symptom än moroten.

I den här studien hade morötterna från Satakunda högre CLso titer än palsternackorna, vilket kan dels bero på vektorn, dels på fysiologiska orsaker. Palsternackan är kanske inte lämplig värdväxt för morotsbladloppan och av denna orsak lägger bladloppan inte ägg på palsternackan. Enligt Valterová m. fl. (1997) kan övriga Apiaceae arter fungera som värdväxt för morotsbladloppan. Trots detta så var antalet ägg på övriga växter få och Valterová m. fl. (1997) skriver också att ägg av morotsbladloppan inte förekom på palsternacka, trots att grödan växte i närheten av infekterade morotsfält. Det kan vara en förklaring till att även i denna studie upptäcktes varken ägg eller nymfer på palsternackorna trots noggrann undersökning. Möjligtvis spenderar morotsbladloppan också kortare tid på palsternackan. Enligt Valterová m. fl. (1997) kan förekomst eller frånvaro av vissa flyktiga föreningar påverka hur attraktiv växten är för morotsbladloppan, ytterligare påverkar tiden som morotsbladloppan spenderar på växten. En kortare tid på värdväxten medför eventuellt dels att andelen CLso bakterier, som inokuleras är färre, dels kanske CLso bakterien inte förökar sig i samma hastighet som i morot och dels kan den lägre titerhalten vara en följd av att vektorns stickande mundel är fysiologiskt anpassad till morot och når inte tillräckligt långt för att nå palsternackans floem. Då den systemiska infektionen av värdväxten sker främst i vertikal riktning än horisontellt (Wang, N. m. fl. 2017) kan dessa tre nämnda orsaker resultera i en lägre titerhalt i palsternacka jämfört med morot.

Antagandet att närbelägna morotsodlingar kunde sprida och öka förekomsten av CLso i palsternacka kunde i denna studie inte uteslutas. En positiv korrelation ( $\chi^2 = 12,80$ ) förekom mellan fördelningen av CLso i morot och palsternacka i Södra Savolax. Men i denna studie var förekomsten av CLso i palsternacka i Savolax inte beroende av CLso förekomsten i de närbelägna morotsodlingarna. Samma tolkning gjordes även gällande fördelningen av CLso i morotsprovena mellan Satakunda och Södra Savolax ( $\chi^2 = 55,06$ ), vilket betyder att CLso fördelningen i morot mellan områden inte är beroende av varandra. En faktor som mycket troligt påverkar förekomsten är storleken på morotsbladloppans population på området, dels det geografiska avståndet samt hindren mellan områdena Södra Savolax och Satakunda, som tidigare redan nämnts.

Intressant nog, så är det svårt att förkasta hypotesen om förekomsten av CLso i palsternacka i Södra Savolax och Satakunda. Skillnaderna i fördelningen av CLso förekomst i palsternackaproven mellan Satakunda och Södra Savolax var små. Eftersom antalet negativa prov var få kunde ett samband inte förkastas (Fischer's exakta test  $p = 0,056$ ,  $p > 0,05$ ). Den positiva skevheten i histogramfördelningen av CLso templat i palsternackaproven i Satakunda och Savolax kan delvis för det första bero på att i Södra Savolax påvisades en annan haplotyp av CLso, haplotyp H. Den andra orsaken kan bero på palsternackans lämplighet som värdväxt för CLso och för det tredje när infektionen sker under odlingssäsongen.

I Satakunda är däremot korrelationen mellan fördelningen av CLso i morot och palsternacka låg ( $\chi^2 = 2,43$ ) och här förekommer det samband mellan CLso förekomsten i morot och palsternacka. CLso hittades ursprungligen i sydvästra Finland och här förekommer sjukdomen också som mest (Haapalainen m. fl. 2017). Övriga orsaker som påverkar förekomsten är storleken på morotsbladloppans populations och dess övervintring. Haapalainen m. fl. (2017) konstaterar att morotsbladloppans population är bestående i Finland.

#### 5.1.4 Korrelation mellan CLso infektion och rotvikt

I tidigare studier har man konstaterat en korrelation mellan CLso infektion och morotens rotvikt (Nissinen m. fl. 2014). Nissinen m. fl. (2014) påvisade att en hög bakterietitermängd signifikant reducerade rotens tillväxt, medan antalet blad i blasten inte

påverkades. I denna studie var korrelationen mellan rot:blast förhållandet och mängden CLso inte signifikant avvikande varken i palsternacka eller morot. I fältförhållanden förekommer många faktorer som påverkar morotens rottillväxt, såsom jordmån, markstruktur, gödsling, nederbörd, tidpunkt för sådd, sort och sortegenskaper. Den gemensamma effekten alla dessa faktorer kan vara orsak till att inverkan av CLso inte kom till uttryck i denna studie, såsom i studier, som gjorts i växthus där alla faktorerna är kontrollerade (Minna Haapalainen, Helsingfors universitet, skriftlig kommentar till skribenten 28.2.2019).

### 5.1.5 Samband mellan CLso infektion och rot:blast förhållande i Satakunda

I korrelationsanalysen mellan morotens rot:blast förhållande och CLso templat/ ng DNA kunde ingen förklaring mellan variablerna fastställas. Utgående från bild 5c är största delen av proven förskjutet mot höger. Även i palsternackan kunde ingen förklaring mellan variablerna fastställas. Däremot ser man tydligare en fördelning av proven i två grupper, vilket även har konstaterats av Nissinen m. fl. (2014) att bakterietitermängden i infekterade morötter inte var normalfördelade utan fördelades mer i två kategorier, de med hög bakterietiter och de med låg bakterietiter. Utgående från resultatet kan konstateras att antingen infekteras moroten och palsternackan eller så infekteras de inte. Det är sällsynt att prov, som är insamlade på hösten, har en medelmåttlig infektionsnivå, där bakteriekoloniseringen är ännu under utveckling (Haapalainen m. fl. 2017). Delvis kan förekomsten och mängden templat / ng DNA i proven vara beroende av när infektion skett och hur morotsbladloppans flygperioden har inträffat i förhållande till växtens utvecklingsstadium, såsom tidigare redan diskuterades i tidigare kapitel.

## 5.2 Förekomst av CLso i vilda växter

Pilört och åkerbinda är allmänt förekommande ogräs i grönsaksodling. År 2016 har CLso haplotype H påvisats i två prov av åkerbinda respektive pilört från Egentliga Finland (Haapalainen m. fl. 2019). I denna studie var alla fyra proven infekterade med CLso. Två av pilörterna var infekterade med CLso haplotype H, medan den ena pilörten och åkerbindan var infekterad med haplotype C. Det är oklart, vilken vektor som sprider CLso haplotype H till de vilda växterna. Från det fält i Satakunda där de två pilörterna med

haplotyp H bekräftades, var palsternackorna infekterade med haplotyp C, liksom en av de tre pilörterna. Pilörten hade dock ett lågt  $C_T$ -värde jämfört med de pilörter som var infekterade med haplotyp H (Tabell 5).

### 5.3 Fylogenetiska analyser

I morot bekräftades haplotyp C både i Satakunda, Egentliga Finland och Södra Savolax. Förekomst av CLso haplotyp C har i tidigare studier bekräftats i både västra Finland och i Savolax trakten (Haapalainen m. fl. 2017). En ny haplotyp av CLso, som sporadiskt hittades åren 2013 och 2016 i morot i Södra Savolax och i åkerbinda och pilört i Egentliga Tavastland år 2016 (Haapalainen m. fl. 2019) upptäcktes nu i denna studie i palsternacka. Haplotyp H bekräftades i palsternackaproven från Södra Savolax samt i pilört- och åkerbinda proven från Satakunda. Både i Satakunda och i Södra Savolax förekommer två sekvenstyper av haplotyp H (Bild 9). I den fylogenetiska studien konstaterades en polymorfisk förändring i gensekvensen *ftsZ*. Förändringar i nukleotidsekvensen kan förändra aminosyrasekvensen och således ge nya egenskaper till haplotypen.

Det är möjligt att det kan förekomma flera populationer eller arter av vektorn (vektorer) som sprider smittan. I Södra Savolax, där de två sekvenstyperna av haplotyp H upptäcktes var fältena belägna 7,2 km ifrån varandra. Däremot i Satakunda förekom båda sekvenstyperna av haplotyp H på samma fält. Intressant är också upptäckten att i det fält i Satakunda där haplotyp H bekräftades i pilörterna var däremot palsternackorna infekterade med haplotyp C ST 1 (C\_18\_3P15L). Denna upptäckt lägger grunden för tanken att det kan vara en här tills okänd vektor som sprider CLso haplotyp H. En ytterligare intressant iakttagelse gäller mängden bakterietemplat i de vilda växterna där nivån av bakterier var betydligt högre i de prov som var infekterade med haplotyp H jämfört med de prov som var infekterade med haplotyp C (Tabell 5).

Haapalainen m. fl. (2018a) påpekar att olika haplotyper av CLso kan förekomma separat i samma region ifall smittan sprids av olika vektorer, som äter av olika värdväxter. Eftersom haplotyp H påvisades i de vilda växterna i Satakunda, men varken i moroten eller palsternackan så är det möjligt att det är olika vektorer som sprider bakterien till familjen Polygonaceae. Dessutom är det intressant att från ett litet prov av några exemplar

av pilört bekräftades två sekvenstyper av haplotyp H i samma fält i Satakunda (Haapalainen m. fl. 2019). Denna upptäckt kan tyda på förekomst av flera populationer av bladloppa på området, men också på att smittan kan spridas av olika arter av bladloppa. Haapalainen m. fl. (2019) överväger att *Aphalara*-arter, som förekommer i Finland, eventuellt kan äta på pilört, men att man vet mycket lite om dessa arters värdväxter och deras kriterier. Enligt en svensk studie har både rundbladloppan *Aphalara rumicicola* och *A. polygona* olika arter av *Polygonum* spp. som värdväxter (Gertsson 2010). *Trioza anthrisci* är även allmän i Sverige har påträffats i bland annat på hundkåx (*Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.), björnlåx (*Heracleum sphondylium* L.) och på palsternacka (Gertsson 2010). I studien av Haapalainen m. fl. (2018a) påvisades både i bladloppan *T. anthrisci* och i hundkåx förekomst av haplotyp C ST3 och ST4. I palsternackorna i Satakunda påträffades däremot ST1 och ST2, som även påvisades i studien av Haapalainen m. fl. (2018a) i både moröt och morötsbladloppa. Men eftersom inga insekter eller bladloppor förekom på de insamlade plantorna så är det för tillfället oklart vilken vektor(er) som har spridit CLso haplotyp H till de vilda växterna och palsternackan.

## 6 SLUTSATSER

Denna studie visade att CLso förekommer allmänt i Satakunda och Egentliga Finland. CLso haplotyp C bekräftades i alla morötsskiften i Satakunda. I Södra Savolax förekom CLso däremot med en betydligt mindre frekvens. I palsternacka var förekomsten av CLso högre än förväntat, både i Satakunda och i Södra Savolax. Däremot i Savolax är förekomsten av CLso i palsternacka inte beroende av de närbelägna morötsodlingarna. Det förekom en positiv korrelation mellan variablerna CLso och område, men fördelningen av CLso i morötsprovena mellan Satakunda och Södra Savolax var olika. De synliga symptomen såsom missfärgning i blåsten förekom allmänt. I de undersökta moröts- och palsternacka blåstproven hade över 90 % av de CLso infekterade proven någon slags grad av missfärgning. I palsternackan var symptomen dock betydligt lindrigare än i moröten. En spekulation angående de lindriga symptomen i palsternacka kunde förklaras med att palsternackan är tålig mot CLso bakteriens närvaro (Minna Haapalainen, Helsingfors Universitet, diskussion med skribenten, 17.9.2018).

En ny haplotyp av CLso upptäcktes i palsternacka på två skiften i Södra Savolax samt i två prov av pilörterna på ett skifte i Satakunda. Palsternackorna insamlades från två olika

skiften, som var belägna cirka 7,2 kilometer från varandra. Eftersom endast tre palsternackaprov sekvenserades, från fältet där haplotyp H förekom, är det ändå troligt att resten av de undersökta palsternackorna var infekterade av samma haplotyp. I denna studie kunde inte direkt påvisas vilken vektor spred den nya haplotypen till palsternackan eller pilörterna, eftersom det på plantorna inte förekom skadeinsekter.

Identifieringen av nya CLso haplotyper skrider snabbt framåt. Haplotyp H är den nionde identifierade '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotypen i världen. I Finland är det bekräftat att det förekommer både haplotyp C och H i palsternacka. Under 2019 har det förutom haplotyp H även identifierades haplotyp F i potatis i Amerika (Swisher Grimm och Garczynski 2019) och haplotyp G i ett herbariumexemplar av *Solanum umbelliferum* (Mauck m. fl. 2019). Swisher Grimm och Garczynski (2019) nämner att det är möjligt att den nya haplotyp F, vilken inducerade liknande Zebra chip symptom i potatisknölen som haplotyp A och B, även kan infektera andra växter inom familjen Solanaceae. Vektorn för haplotyp F är för tillfället okänd, skriver Swisher Grimm och Garczynski (2019) och föreslår att, ytterligare studier angående interaktion mellan vektor och värd behövs samt studier gällande sambandet mellan haplotyperna A, B och F. Samma gäller också för de nya haplotyperna G och H. Mauck m. fl. (2019) föreslår att herbariebaserade studier kunde vara användbart i studier för att öka kunskapen om CLso bakteriens mångfald och för att upptäcka nya sammankopplingar mellan värd och patogen. Ytterligare studier behövs för att ta reda på sambandet mellan haplotyp C och H och hur omfattande förekomsten av haplotyp H är i Finland med tanke på odling av morot- och palsternacka. Dessutom skulle det vara skäl att undersöka vektorn (vektorerna) som sprider CLso haplotyp H. CLso haplotyp H har i ett tidigt skede separerats från CLso stamlinjen (Haapalainen m. fl. 2019). Har CLso haplotyp H då kanske anpassat sig till växtarter inom släkten Polygonaceae som en följd av separeringen? Eftersom det nu har påvisats att CLso förekommer, förutom inom familjen Apiaceae, även i pilört och åkerbinda, vilka hör till familjen Polygonaceae så är frågan, kan även andra odlingsväxter inom denna familj, som exempelvis bovete (*Fagopyrum esculentum* Moench) eller rabarber (*Rheum rhabarbarum* L.) fungera som alternativa värdväxter för haplotyp H?

## 7 TACK

Jag vill rikta ett stort tack till docent Minna Haapalainen, som handlett och alltid varit till hands och anträffbar då jag behövt hjälp eller haft frågor angående arbetet. Minnas hjälp och goda råd har varit av mycket stor betydelse för mig. Jag vill också tacka ProAgrias trädgårdsrådgivare Marja Tuononen och NTM-centralens granskare Heikki Häkkinen, som hjälpte till med insamlingen av morots- och palsternacka proven. Stort tack även till laborationstekniker Eija Takala på Helsingfors universitet, min studiekamrat Heli Lehtinen och Tina Halin, min dotter Pi Wickström och min bonusdotter Emma Packalén, som ställde upp för att hjälpa mig med morots- och palsternacka proven då det var som mest brådslande att få alla prover utvärderade och preparerade för analys. Jag vill också rikta ett stort tack till min studiekamrat och opponent, Juho Ahlberg, som gav mig många goda förbättringsförslag för skrivandet av min magistersavhandling.



## KÄLLFÖRTECKNING

- Alfaro-Fernández, A., Siverio, F., Cebrián, M. C., Villaescusa, F. J. & Font, M. I. 2012. ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ associated with *Bactericera trigonica* - affected carrots in the Canary Islands. *Plant Disease* 96: 581-581.
- Alfaro-Fernández, A., Verdeguer, M., Rodríguez-León, F., Ibáñez, I., Hernández, D., Teresani, G. R., Bertolini, E., Cambra, M. & Font, M.I. 2017. Search for reservoirs of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ and mollicutes in weeds associated with carrot and celery crops. *European Journal of Plant Pathology* 147: 15-20.
- Alvarado, V. Y., Odokonyero, D., Duncan, O., Mirkov, T. E. & Scholthof, H. B. 2012. Molecular and physiological properties associated with zebra complex disease in potatoes and its relation with *Candidatus Liberibacter* contents in psyllid vectors. *PLoS One* 7: e37345.
- Buske, P. J. & Levin, P. A. 2013. A flexible C-terminal linker is required for proper FtsZ assembly in vitro and cytokinetic ring formation in vivo. *Molecular Microbiology* 89: 249-263.
- EPPO. 2013. Data sheets on pests recommended for regulation. ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’. *Bulletin. OEPP/EPPO Bulletin* 43: 197-201.
- Gertsson, C. A. 2010. Fångst av bladloppor (Hemiptera: Psylloidea) från Svenska Malaiséfälleprojektet-nya provinsfynd samt sällsynt förekommande arter i Sverige. *Entomologisk Tidskrift* 131: 55-65.
- Haapalainen, M. 2014. Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology* 165: 172–198.
- Haapalainen, M., Kivimäki, P., Latvala, S., Rastas, M., Hannukkala, A., Jauhiainen, L., Lemmetty, A., Pirhonen, M., Virtanen, A. & Nissinen, A. I. 2017. Frequency and occurrence of the carrot pathogen ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ haplotype C in Finland. *Plant Pathology* 66: 559-570.

- Haapalainen, M., Latvala, S., Rastas, M., Wang, J., Hannukkala, A., Pirhonen, M. & Nissinen, A. I. 2018b. Carrot pathogen '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotype C detected in symptomless potato plants in Finland. *Potato Research* 61: 31-50.
- Haapalainen, M., Latvala, S., Wickström, A., Wang, J., Pirhonen, M. & Nissinen, A. 2019. A novel haplotype of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' found in Apiaceae and Polygonaceae family plants. *European Journal of Plant Pathology* <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01890-0>
- Haapalainen, M., Wang, J., Latvala, S., Lehtonen, M. T., Pirhonen, M. & Nissinen, A. I. 2018a. Genetic variation of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotype C and identification of a novel haplotype from *Trioza urticae* and stinging nettle. *Phytopathology* 108: 925-934.
- Hajri, A., Loiseau, M., Cousseau-Suhard, P., Renaudin, I. & Gentit, P. 2017. Genetic characterization of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' haplotypes associated with apiaceous crops in France. *Plant Disease* 101: 1383-1390.
- Kristoffersen, L. & Anderbrant, O. 2007. Carrot psyllid (*Trioza apicalis*) winter habitats—insights in shelter plant preference and migratory capacity. *Journal of Applied Entomology* 131: 174-178.
- Kumar S., Stecher G., Li, M., Knyaz C. & Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Levy, J., Ravindran, A., Gross, D., Tamborindeguy, C. & Pierson, E. 2011. Translocation of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the zebra chip pathogen, in potato and tomato. *Phytopathology* 101: 1285-1291.

- Li, W., Abad, J. A., French-Monar, R. D., Rascoe, J., Wen, A., Gudmestad, N. C., Secor, G. A., Lee, I. -M., Duan, Y. & Levy, L. 2009. Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in potato plants with zebra chip. *Journal of Microbiological Methods* 78: 59-65.
- Li, W., Hartung, J. S. & Levy, L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104-115.
- Liefting, L. W., Sutherland, P. W., Ward, L. I., Paice, K. L., Weir, B. S. & Clover, G. R. G. 2009a. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease* 93: 208–214.
- Liefting L. W., Weir B. S., Pennycook S. R. & Clover G. R. G. 2009b. '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', associated with plants in the family Solanaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2274–2276.
- Luke 2019. Puutarhatilastot 2018. <http://stat.luke.fi/puutarhatilastot> Helsingfors, Finland: Naturresursinstitutet. Publicerat 26.3.2019, refererat 04.05.2019.
- Markkula, M., Laurema, S. & Tiittanen, K. 1976. Systemic damage caused by *Trioza apicalis* on carrot. *Symposia Biologica Hungarica* 16: 153-155.
- Mauck, K. E., Sun, P., Meduri, V., & Hansen, A. K. 2019. New *Ca. Liberibacter* psyllaourous haplotype resurrected from a 49-year-old specimen of *Solanum umbelliferum*: a native host of the psyllid vector. *Scientific Reports* 9: 1-13
- Meteorologiska insitutet 2018. Kuukausitilastot. <https://ilmatieteenlaitos.fi/kuukausitilastot>. Helsingfors, Finland: Meteorologiska institutet. Refererat 11.12.2018.
- Munyanenza, J. E. 2012. Zebra chip disease of potato: biology, epidemiology, and management. *American Journal of Potato Research* 89: 329-350.

- Munyanzeza, J. E., Crosslin, J. M., & Upton, J. E. 2007. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “zebra chip,” a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 100: 656-663.
- Munyanzeza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., & Lemmetty, A. 2010a. First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" Associated with Psyllid-Affected Carrots in Europe. *Plant Disease* 94: 639.
- Munyanzeza, J. E., Fisher, T. W., Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A. & Lemmetty, A. 2010b. Association of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" with the psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. *Journal of Economic Entomology* 103: 1060-1070.
- Munyanzeza, J. E., Sengoda, V. G., Sundheim, L., & Meadow, R. 2014. Survey of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in carrot crops affected by the psyllid *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Norway. *Journal of Plant Pathology* 96: 397-402.
- Munyanzeza, J. E., Swisher, K. D., Hommes, M., Willhauck, A., Buck, H. & Meadow, R. 2015. First report of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' associated with psyllid-infested carrots in Germany. *Plant Disease* 99: 1269.
- Nehlin, G., Valterová, I. & Borg-Karlsson, A-K. 1994. Use of conifer volatiles to reduce injury caused by carrot psyllid, *Trioza apicalis*, Förster (Homoptera, Psylloidea). *Journal of Chemical Ecology* 20: 771-783.
- Nelson, W. R., Fisher, T. W. & Munyanzeza, J.E. 2011. Haplotypes of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' suggest long-standing separation. *European Journal of Plant Pathology* 130: 5–12.
- Nissinen, A. I., Haapalainen, M., Jauhiainen, L., Lindman, M. & Pirhonen, M. 2014. Different symptoms in carrots caused by male and female carrot psyllid feeding and infection by '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. *Plant Pathology* 63: 812-820.

- Nissinen, A. I., Lemmetty, A., Pihlava, J. M., Jauhiainen, L., Munyaneza, J. E. & Vanhala, P. 2012. Effects of carrot psyllid (*Trioza apicalis*) feeding on carrot yield and content of sugars and phenolic compounds. *Annals of Applied Biology* 161: 68-80.
- Nissinen, A., Vanhala, P., Holopainen, J. K. & Tiilikkala, K. 2007. Short feeding period of carrot psyllid (*Trioza apicalis*) females at early growth stages of carrot reduces yield and causes leaf discolouration. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 125: 277–283.
- QIAGEN 2010. Critical factors for successful Real-time PCR. Real-Time PCR Brochure. <https://www.gene-quantification.de/qiagen-qpcr-sample-assay-tech-guide-2010.pdf>.  
Publicerat 07/2010. Refererat 4.2.2019.
- Secor, G. A., Riviera, V. V., Abad, J. A., Lee, I. M., Clover, G. R. G., Liefting, L. W., Li, X. & De Boer, S. H. 2009. Association of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease* 93: 574-583.
- Swisher Grimm, K. D. & Garczynski, S. F. 2019. Identification of a new haplotype of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in *Solanum tuberosum*. *Plant Disease* 103: 468-474.
- Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Teresani, G. R., Bertolini, E., Alfaro-Fernández, A., Martínez, C., Tanaka, F. A. O., Kitajima, E. W., Roselló, M., Sanjuán, S., Ferrándiz, J. C., López, M. M, Cambra, M & Font, M. I. 2014. Association of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ with a vegetative disorder of celery in Spain and development of a real-time PCR method for its detection. *Phytopathology* 104: 804-811.

- Valterová, I., Nehlin, G. & Borg-Karlson, A-K. 1997. Plant chemistry and preferences in egg-laying *Trioza apicalis* (Homoptera, Psylloidea). *Host Biochemical Systematics and Ecology* 25: 477-491.
- Wang, J., Haapalainen, M., Schott, T., Thompson, S., Smith, G., Nissinen, A. & Pirhonen, M. 2017. Genomic sequence of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ haplotype C and its comparison with haplotype A and B genomes. *PLoS One* 12 (2): e0171531.
- Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y., Li, J., Rangel, L. T. & Martins Jr, J. 2017. The *Candidatus Liberibacter*–host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annual Review of Phytopathology* 55: 451-482.

## BILAGA 1 DNEASY® PLANT MINI KIT QUICK-START PROTOKOLL

Quick-Start Protocol March 2016

### DNeasy® Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year if not otherwise stated on label.

Further information

- *DNeasy Plant Handbook*: [www.qiagen.com/HB-1166](http://www.qiagen.com/HB-1166)
- Safety Data Sheets: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)
- Technical assistance: [support.qiagen.com](mailto:support@qiagen.com)

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AW1 concentrates.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples ( $\leq 100$  mg wet weight or  $\leq 20$  mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser II or a mortar and pestle.
2. Add 400  $\mu$ l Buffer AP1 and 4  $\mu$ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation.

**Note:** Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

3. Add 130  $\mu$ l Buffer P3. Mix and incubate for 5 min on ice.
4. **Recommended:** Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AW1, and mix by pipetting.
7. Transfer 650  $\mu$ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g ( $\geq 8000$  rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500  $\mu$ l Buffer AW2, and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g. Discard the flow-through.
9. Add another 500  $\mu$ l Buffer AW2. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
- Note:** Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.
10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
11. Add 100  $\mu$ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g.
12. Repeat step 11.

Ordering [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Technical Support [support.qiagen.com](mailto:support@qiagen.com) | Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

## BILAGA 2 UTSPÄDNINGSTABELL

Set	Prov	realtds-PCR kod	ng/μL	Utspädning	Set	Prov	realtds-PCR kod	ng/μL	Utspädning
6	P7l	1	7,8	1:10	1	P3l	54	19,9	1:20
2	P10l	2	8,1	1:10	2	P7l	55	20,0	1:30
3	P2l	3	8,8	1:10	3	P11r	56	20,0	1:30
3	P1l	4	9,5	1:10	2	P6l	57	20,1	1:30
3	P7l	5	9,9	1:10	6	P8r	58	20,1	1:30
3	P4l	6	10,0	1:20	3	P12l	59	20,4	1:30
3	P6l	7	10,4	1:20	1	P8l	60	20,7	1:30
1	P4r	8	10,6	1:20	3	P14l	61	20,8	1:30
3	P5r	9	10,6	1:20	9	P2l	62	20,9	1:30
3	P5l	10	10,9	1:20	11	P5l	63	21,0	1:30
1	P5r	11	11,0	1:20	6	P4l	64	21,7	1:30
1	P7r	12	11,4	1:20	1	P9l	65	21,8	1:30
3	P3l	13	12,6	1:20	3	P2r	66	22,0	1:30
	Tatar1	14	12,7	1:20	6	P9l	67	22,1	1:30
3	P13l	15	13,2	1:20	6	P1l	68	22,3	1:30
3	P9l	16	13,6	1:20	2	P5l	69	22,4	1:30
3	P4r	17	13,7	1:20	6	P2r	70	22,4	1:30
3	P9r	18	13,9	1:20	3	P18l	71	22,8	1:30
2	P3l	19	14,0	1:20	9	P6l	72	23,0	1:30
3	P10r	20	14,0	1:20	11	P10l	73	23,2	1:30
6	P5l	21	14,0	1:20	9	P5l	74	23,5	1:30
1	P6r	22	14,4	1:20	2	P1l	75	25,3	1:30
1	P9r	23	14,4	1:20	6	P10r	76	25,8	1:30
3	P8r	24	14,6	1:20	9	P3r	77	26,1	1:30
6	P6l	25	14,6	1:20	9	P2r	78	26,7	1:30
3	P6r	26	14,7	1:20	6	P5r	79	27,0	1:30
3	P11l	27	14,8	1:20	3	P17l	80	27,6	1:30
3	P3r	28	15,1	1:20	9	P4l	81	28,2	1:30
1	P3r	29	15,6	1:20	11	P9r	82	28,5	1:30
3	P19l	30	15,7	1:20	11	P6l	83	28,6	1:30
3	P8l	31	15,9	1:20	2	P9r	84	28,7	1:30
3	P7r	32	16,3	1:20	6	P4r	85	28,8	1:30
	Tatar3	33	16,6	1:20	3	P15l	86	29,1	1:30
1	P10r	34	16,9	1:20	2	P5r	87	29,2	1:30
6	P1r	35	16,9	1:20	9	P3l	88	29,2	1:30
6	P2l	36	17,0	1:20		Tatar2	89	29,2	1:30
1	P8r	37	17,2	1:20	9	P4r	90	29,4	1:30
11	P8l	38	17,3	1:20	6	P9r	91	29,7	1:30
3	P1r	39	17,4	1:20	2	P6r	92	30,4	1:40
2	P4l	40	17,5	1:20	3	P19r	93	30,8	1:40
1	P2l	41	17,9	1:20		Kiertotatar	94	30,8	1:40
1	P5l	42	17,9	1:20	6	P7r	95	32,2	1:40
2	P9l	43	17,9	1:20	1	P10l	96	32,3	1:40
6	P8l	44	18,3	1:20	9	P1l	97	32,4	1:40
2	P2l	45	18,5	1:20	6	P6r	98	34,0	1:40
2	P8l	46	18,6	1:20	11	P4l	99	35,1	1:40
6	P3l	47	18,6	1:20	3	P13r	100	35,6	1:40
6	P10l	48	18,6	1:20	2	P8r	101	36,1	1:40
1	P7l	49	18,8	1:20	9	P1r	102	36,2	1:40
11	P9l	50	18,8	1:20	6	P3r	103	36,6	1:40
11	P10r	51	18,8	1:20	3	P12r	104	38,0	1:40
1	P1l	52	19,5	1:20	11	P8r	105	38,6	1:40
1	P4l	53	19,8	1:20	1	P2r	106	38,9	1:40



realtid-PCR					realtid-PCR				
Set	Prov	kod	ng/μL	Utspädning	Set	Prov	kod	ng/μL	Utspädning
1	P6l	107	39,0	1:40	9	C12	163	17,9	1:20
2	P3r	108	40,0	1:50	2	C2	164	18,3	1:20
3	P15r	109	40,1	1:50	2	C6	165	18,3	1:20
3	P10l	110	40,8	1:50	12	C2	166	18,5	1:20
3	P14r	111	41,3	1:50	2	C1	167	18,6	1:20
11	P2l	112	42,0	1:50	2	C3	168	18,6	1:20
2	P2r	113	42,1	1:50	6	C6	169	18,6	1:20
3	P17r	114	42,5	1:50	3	C7	170	18,7	1:20
2	P4r	115	43,0	1:50	1	C8	171	18,8	1:20
9	P5r	116	43,1	1:50	2	C8	172	18,9	1:20
2	P10r	117	45,4	1:50	13	C5	173	19,2	1:20
11	P1l	118	45,6	1:50	1	C2	174	19,3	1:20
2	P1r	119	46,2	1:50	2	C7	175	19,3	1:20
9	P6r	120	46,2	1:50	6	C4	176	19,4	1:20
11	P6r	121	51,1	1:60	6	C9	177	19,8	1:20
11	P7r	122	53,5	1:60	4	C12	178	19,9	1:20
3	P16r	123	53,8	1:60	4	C18	179	19,9	1:20
11	P5r	124	55,4	1:60	4	C4	180	20,0	1:30
3	P16l	125	55,6	1:60	2	C10	181	20,1	1:30
2	P7r	126	56,1	1:60	10	C9	182	20,1	1:30
11	P2r	127	58,3	1:60	5	C3	183	20,3	1:30
3	P18r	128	58,5	1:60	3	C5	184	21,1	1:30
11	P1r	129	60,2	1:70	5	C17	185	21,2	1:30
11	P4r	130	60,2	1:70	4	C5	186	21,3	1:30
1	P1r	131	63,3	1:70	3	C3	187	21,8	1:30
11	P3l	132	65,5	1:70	3	Ulvila	188	21,8	1:30
11	P3r	133	70,8	1:80	6	C1	189	22,0	1:30
11	P7l	134	80,3	1:80	6	C8	190	22,0	1:30
10	C5	135	7,2	1:10	12	C7	191	22,2	1:30
1	C10	136	9,7	1:10	3	C1	192	22,4	1:30
10	C7	137	10,1	1:20	9	C8	193	22,4	1:30
10	C1	138	10,6	1:20	9	C9	194	22,8	1:30
7	C5	139	11,3	1:20	2	C5	195	22,9	1:30
7	C6	140	11,3	1:20	9	C3	197	22,9	1:30
10	C8	141	11,4	1:20	9	C14	198	22,9	1:30
9	C13	142	11,7	1:20	10	C4	199	23,1	1:30
1	C6	143	12,8	1:20	3	C2	200	23,5	1:30
5	C6	144	12,9	1:20	9	C4	201	23,6	1:30
10	C6	145	13,4	1:20	12	C13	202	23,7	1:30
2	C4	146	13,6	1:20	6	C3	203	23,9	1:30
1	C3	147	13,7	1:20	3	C10	204	24,8	1:30
8	C8	148	14,3	1:20	8	C10	196	22,9	1:30
10	C3	149	15,1	1:20	5	C15	205	24,9	1:30
9	C15	150	15,2	1:20	13	C6	206	25,2	1:30
6	C2	151	15,4	1:20	2	C9	207	25,4	1:30
1	C5	152	15,9	1:20	3	C4	208	25,5	1:30
6	C10	153	16,2	1:20	8	C1	209	27,0	1:30
10	C2	154	16,3	1:20	3	C9	210	27,1	1:30
6	C5	155	16,6	1:20	3	C6	211	27,2	1:30
6	C7	156	16,7	1:20	8	C9	212	27,9	1:30
9	C11	157	16,8	1:20	13	C8	213	28,1	1:30
1	C4	158	16,9	1:20	9	C10	214	28,3	1:30
12	C5	159	16,9	1:20	1	C9	215	28,6	1:30
7	C9	160	17,2	1:20	13	C9	216	28,9	1:30
1	C1	161	17,3	1:20	8	C3	217	30,0	1:40
1	C7	162	17,7	1:20	8	C2	218	30,2	1:40

Set	Prov	realtids- PCR kod	ng/ $\mu$ L	Utspädning
3	C8	219	30,3	1:40
9	C1	220	30,5	1:40
8	C4	221	31,3	1:40
7	C10	222	31,4	1:40
9	C2	223	32,2	1:40
13	C2	224	32,7	1:40
8	C5	225	36,2	1:40
8	C7	226	37,1	1:40
9	C7	227	37,7	1:40
8	C6	228	43,2	1:50
9	C6	229	76,7	1:80
12	C4	230	21,4	1:30
12	C6	231	17,4	1:20
2017	2/12	NC1	17,4	1:100
2017	6/2	NC2	10,6	1:100
2017	SV1L	PC	20,5	std

## BILAGA 3 SOND-QPCR PROTOKOLL FÖR DETEKTERING AV CLSO

### **Liberibacter solanacearum-specifika**

#### **Startsekvenser:**

**LsoF** 5' -GTCGAGCGCTTATTTTAAATAGGA-3'

**HLBr** 5' -GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3'

#### **Sond:**

**HLBp** 5' -AGACGGGTGAGTAACGCG-3'

Markör: 5', 6-carboxy-fluorescein (FAM), 3', Black Hole Quencher (BHQ-1)

**Referens:** Li et al. 2009, Journal of Microbiological Methods 78: 59–65

#### **Reaktions blandning 20 µl:**

10.0 µl Maxima Probe qPCR master mix (2x)

0.48 µl Startsekvens LsoF, 240 nM (stamlösning 10 µM)

0.48 µl Startsekvens HLBr, 240 nM (stamlösning 10 µM)

0.24 µl Sond HLBp, 120 nM (stamlösning 10 µM)

3.80 µl Nuclease-fritt H<sub>2</sub>O

5 µl Utspädd DNA prov

### **26-29.10.2018 Realtids-PCR**

Analysera 231 DNA prov av morot, palsternacka, åkerbinda och pilört som insamlades från fälten i september 2019.

DNA prov utspädning 1/100 (1 uL prov, 99 uL MQ vatten)

Förbered utspädningarna i 96-brunnars platta:

Prov platta 1, PCR-strips 1-12

Inkluderar negativ kontroll: NC1 (2017-2-12) och NC2 (2017-6-2)

Prov platta 2, PCR-strips 15-26

Separata PCR-strips:

Prov PCR-strips 13, 14, 27-29

Positiv standard utspädningsserie: morot SV1L (Savivainio 14.9.2017)

Kontroll	Utspädning	µl DNA preparat	µl vatten
Std1	1/30	3	87
Std2	1/100	1	99
Std3	1/300	10 of 1/30	90
Std4	1/1000	10 of 1/100	90
Std5	1/3000	10 of 1/300	90
Std6	1/10000	10 of 1/1000	90
Std7	1/30000	10 of 1/3000	90
Std8	1/100000	10 of 1/10000	90

real-tids-PCR reaktion beståndsdelar	Reaktions blandning 20 µl	Master mix x200 (3.0 ml)	Master mix x400 (6.0 ml)
Sond qPCR master mix (2x)	10.0 µl	2.0 ml	4.0 ml
Startsekvens LsoF, 240 nM (stamlösning 10 µM) <a href="#">förbehandlad 23.10.18</a>	0.48 µl	96.0 µl	192.0 µl
Startsekvens HLBr, 240 nM (stamlösning 10 µM) <a href="#">förbehandlad 23.10.18</a>	0.48 µl	96.0 µl	192.0 µl
Sond HLBp, 120 nM (stamlösning 10 µM) <a href="#">förbehandlad 23.10.18</a>	0.24 µl	48.0 µl	96.0 µl
Nukleas-fritt H <sub>2</sub> O (PCR kvalite)	3.80 µl	760 µl	1.520 ml
DNA prov	5.0 µl		

- 15 µl master mix per brunn
- 5 µl utspädd DNA prov per brunn

Centrifugera plattan med 3000 rpm i 2 minuter och täck den med optisk plast film  
 PCR Program: dual colour FAM/HEX, 95°C i 10 minuter, 45x (95°C 15 s, 60°C 60 s)

**Prov plattor (96 brunnar) och PCR-strips (8 brunnar)****Prov Platta 1**

Strip	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC1	NC2	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
B	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
C	2	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
D	3	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
E	4	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
F	5	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
G	6	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
H	7	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94

**Prov Platta 2**

Strip	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
A	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191	199
B	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192	200
C	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185	193	201
D	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186	194	202
E	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187	195	203
F	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188	196	204
G	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189	197	205
H	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190	198	206

**PCR-Strips för enskilda prov**

13	14	PC	27	28	29
95	103	St1	207	215	223
96	104	St2	208	216	224
97	105	St3	209	217	225
98	106	St4	210	218	226
99	107	St5	211	219	227
100	108	St6	212	220	228
101	109	St7	213	221	229
102	110	St8	214	222	NC

**BILAGA 4 QIAQUICK® PCR PURIFICATION KIT (250)**

1. Add 5 volumes (200 µl) of Buffer PB to a 1,5 µl eppendorf tube and then 1 volume (40 µl) of the PCR sample and mix (if color is orange or violet check instruction protocol).
2. Apply sample to QIAquick column and centrifuge for 60 sek (13000 rpm). Discard flow-through and place the column back to same tube.
3. Add 750 µl Buffer PE to column and centrifuge for 60 sek. Discard flow-through and place the column back to same tube.
4. Centrifuge once more for 1 min to remove residual wash buffer.
5. Place the column into a clean 1,5 ml Eppendorf tube.
6. Elute DNA with pre-heated (65 °C ) MQ water 50 µl, incubate 1 min before centrifuge 1 min 13000rpm.
7. Measure DNA concentration with Nanodrop.

## BILAGA 5 UTRÄKNING AV RELATIV BAKTERIETITER

Standard	Utspädning	Log(utspädning)	C <sub>t</sub> (PC1)	C <sub>t</sub> (PC2)	C <sub>t</sub> (PC3)
St1	0,03333	-1,47712	21,90	21,93	20,95
St2	0,01000	-2	23,57	23,15	22,53
St3	0,00333	-2,47712	25,61	25,40	24,49
St4	0,00100	-3	26,91	26,67	25,75
St5	0,00033	-3,47712	29,12	28,90	27,91
St6	0,00010	-4	30,33	30,05	29,32
St7	0,00003	-4,47712	32,60	32,53	31,21
St8	0,00001	-5	33,70	33,29	32,33
Effektivitetstal			1,9603	1,9745	2,0017

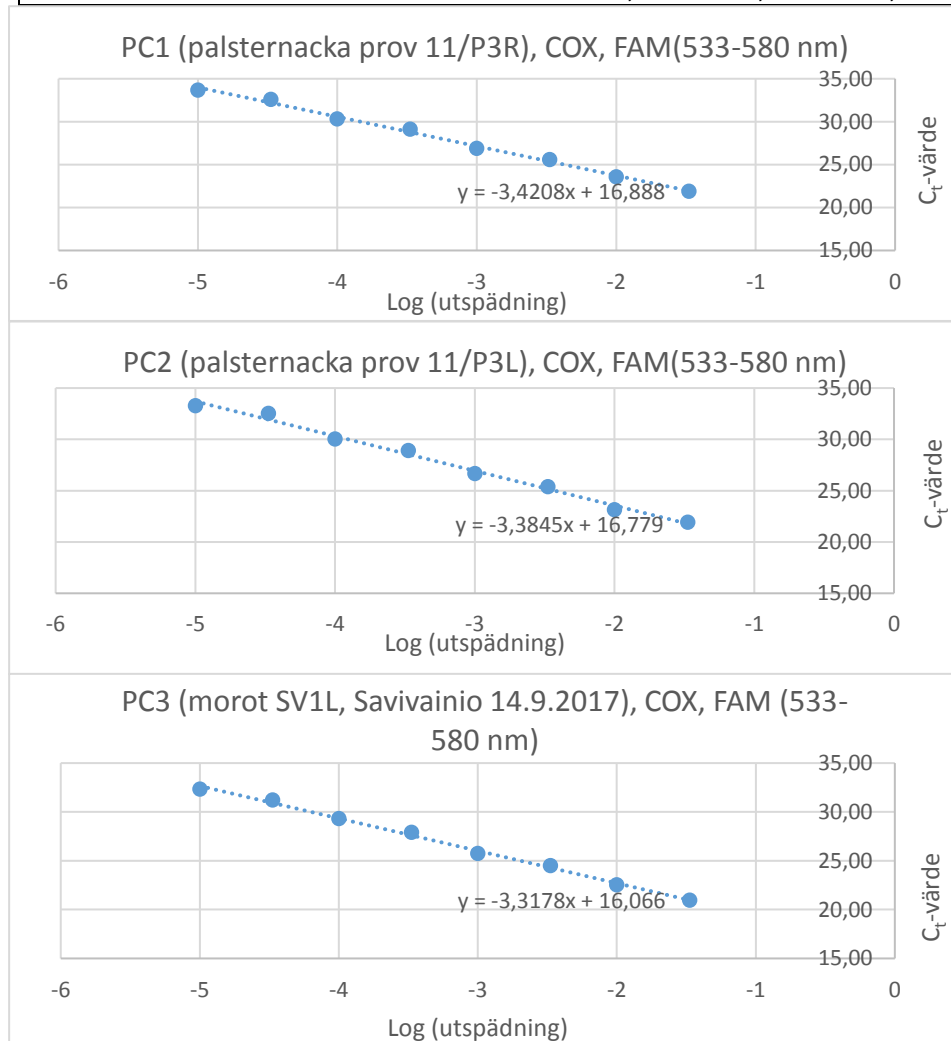


Bild A. Standardkurva av en serieutspädning av extraherat DNA från CLso infekterad palsternackarot och blast samt morotblast. Erhållen från realtids-PCR med startsekvenssond COXf, COXr och COXp uppsättning. Amplifieringens effektivitet uträknad på basen av en utspädningsseriens vinkelkoefficient. Teoretiskt ska vinkelkoefficienten (k) vara -3,32, då E-värdet är 2, vilket betyder att produkten då fördubblas vid varje amplifieringscykel. E-värdet kan uträknas enligt formeln  $E = 10^{(-1/k)}$ .

Standard	Utspädning	Log(utspädning)	C <sub>t</sub> (PC1)	C <sub>t</sub> (PC2)	C <sub>t</sub> (PC3)
St1	0,03333	-1,47712	22,68	20,64	20,06
St2	0,01000	-2	24,31	21,84	21,60
St3	0,00333	-2,47712	26,39	24,16	23,65
St4	0,00100	-3	27,57	25,24	24,89
St5	0,00033	-3,47712	29,81	27,59	26,99
St6	0,00010	-4	30,91	28,73	28,34
St7	0,00003	-4,47712	33,31	30,91	30,33
St8	0,00001	-5	34,21	32,00	31,33
Effektivitetstal			1,9847	1,9906	2,0111

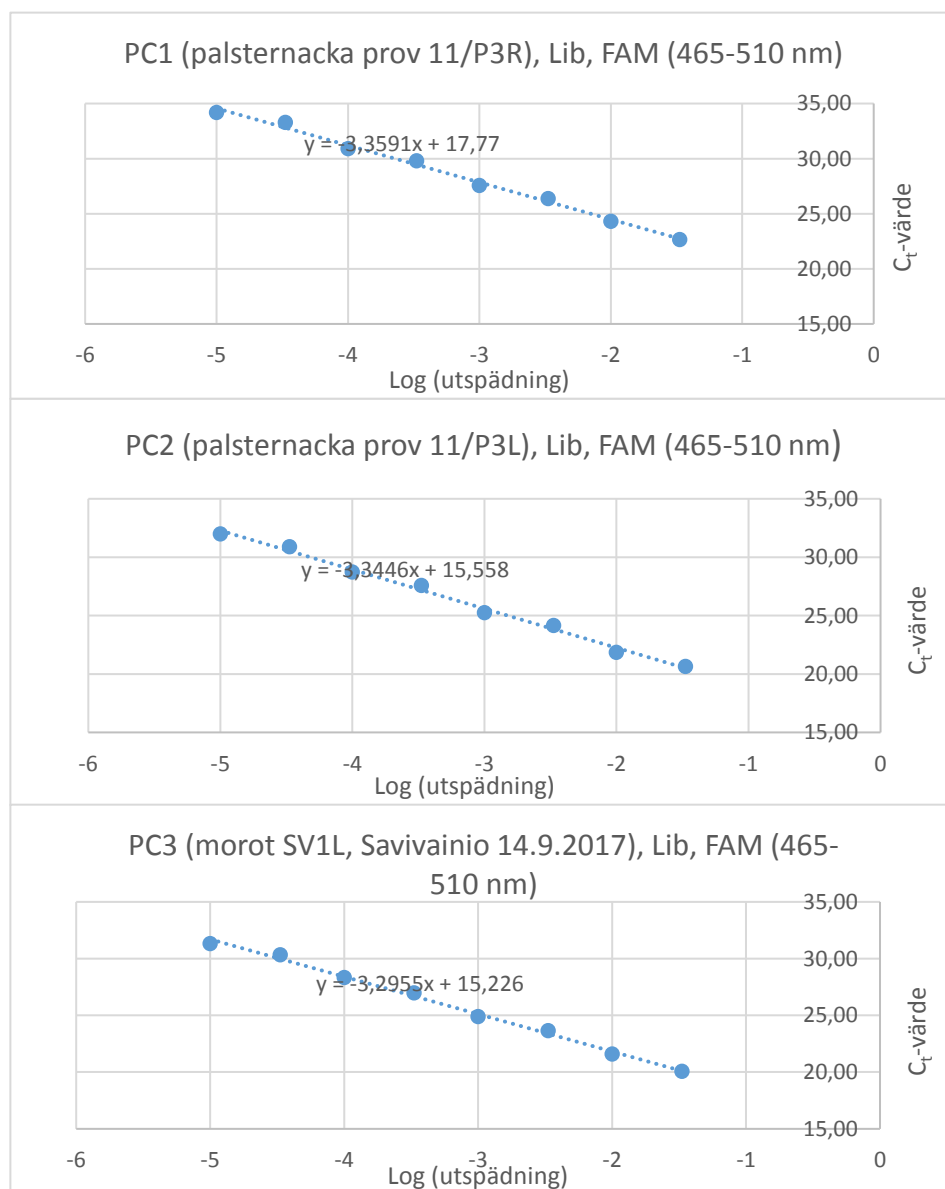


Bild B. Standardkurva av en serieutspädning av extraherat DNA från CLso infekterad palsternacka rot och blast samt morot blast. Erhållen från Realtids-PCR med startsekvenssond kombination HLBr, LsoF och HLBP. Amplifieringens effektivitet uträknad på basen av en utspädningsseriens vinkelkoefficient. Teoretiskt ska vinkelkoefficienten (k) vara -3,32 då E-värdet är 2, vilket betyder att produkten då fördubblas vid varje amplifieringscykel. E-värdet kan uträknas enligt formeln  $E = 10^{(-1/k)}$ .



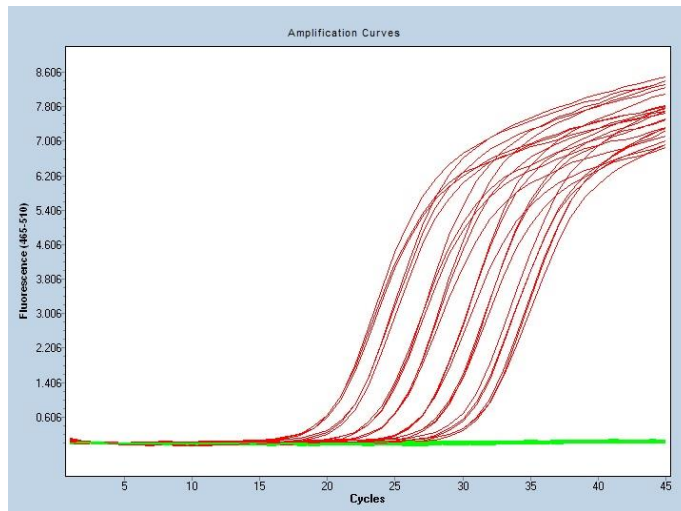


Bild C. Morot blast standardserie FAM, amplifieringskurva av utspädningsseriens respektive tre parallellprov.

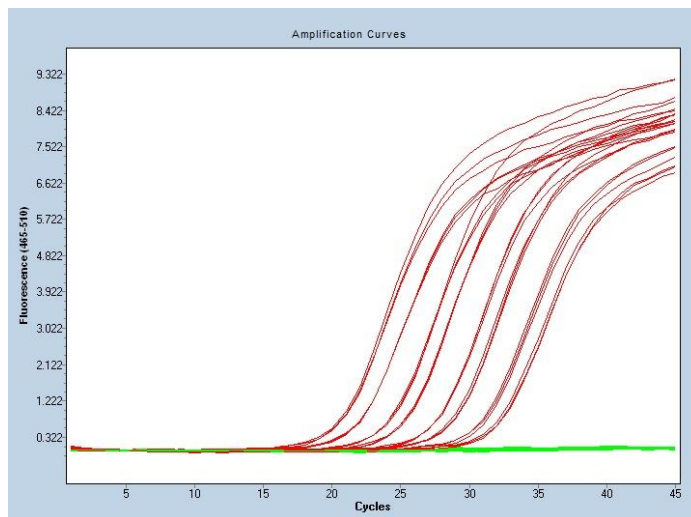


Bild D. Palsternacka blast standardserie FAM, amplifieringskurva av utspädningsseriens respektive tre parallellprov.

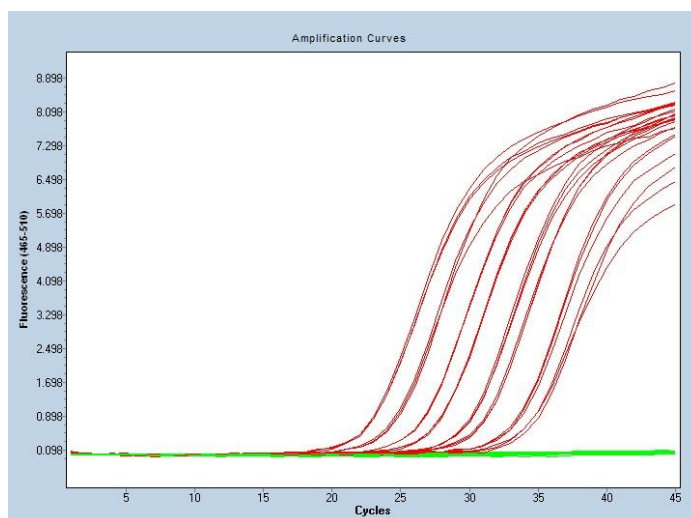


Bild E. Palsternacka rot standardserie FAM, amplifieringskurva av utspädningsseriens respektive tre parallellprov.

## BILAGA 6 SEKVENSLISTA AV GENREGIONEN *FTSZ* OCH DESS PROTEINSAMMANSÄTTNING FÖR JÄMFÖRELSE AV GENOTYPER AV '*CANDIDATUS LIBERIBACTER* *SOLANACEARUM*'.

C\_15-P24a

```
aggct ctt gaa ggc gtc atc cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat
  A L E G V I R V S V V A T G I D N R F H
aga gat aaa gat gat gat gat caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca
  R D K D D D D Q K N S L D S E N E P F A
aac tca aaa cta ttc aat att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat
  N S K L F N I A S R K L T N D Q H V A H
gat aat gaa gtc gtt aag gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att
  D N E V V K D S S L I Q N K E M M D N I
aat cat gat aaa aca gat gtt cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa
  N H D K T D V P V K E G E K D F F I N E
gat att atc cct gaa tct tct aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa
  D I I P E S S N P H R H V P K I F I E E
agt tgt cct atg gaa gag cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt
  S C P M E E R G V M A L I K R I A H S F
ggg ttg cgt gaa gat ata tct acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg
  G L R E D I S T K R D S A P L K D K A T
gtt tct aac ttg aaa gag aag att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat
  V S N L K E K I V F S P Q D S E D N V H
gtg caa tca aaa tca cct ttc aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
  V Q S K S P F N Y E K D Q L E I P A
```

C\_13-12

```
aggct ctt gaa ggc gtc atc cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat
  A L E G V I R V S V V A T G I D N R F H
aga gat aaa gat gat gat gat caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca
  R D K D D D D Q K N S L D S E N E P F A
aac tca aaa cta ttc aat att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat
  N S K L F N I A S R K L T N D Q H V A H
gat aat gaa gtc gtt aag gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att
  D N E V V K D S S L I Q N K E M M D N I
aat cat gat aaa aca gat gtt cct gta aaa gag ggg gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa
  N H D K T D V P V K E G E K D F F I N E
gat att atc cct gaa tct tct aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa
  D I I P E S S N P H R H V P K I F I E E
agt tgt cct atg gaa gag cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt
  S C P M E E R G V M A L I K R I A H S F
ggg ttg cgt gaa gat ata tct acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg
  G L R E D I S T K R D S A P L K D K A T
gtt tct aac ttg aaa gag aag att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat
  V S N L K E K I V F S P Q D S E D N V H
gtg caa tca aaa tca cct ttc aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
  V Q S K S P F N Y E K D Q L E I P A
```

C\_15-214

```
aggct ctt gaa ggc gtc atc cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat
  A L E G V I R V S V V A T G I D N R F H
aga gat aaa gat gat gat gat caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca
  R D K D D D D Q K N S L D S E N E P F A
aac tca aaa cta ttc aat att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat
  N S K L F N I A S R K L T N D Q H V A H
gat aat gaa gtc gtt aag gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att
  D N E V V K D S S L I Q N K E M M D N I
aat cat gat aaa aca gat gtt cct gta aaa gag ggg gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa
  N H D K T D V P V K E G E K D F F I N E
gat att atc cct gaa tct tct aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata tct ata gag gaa
  D I I P E S S N P H R H V P K I S I E E
agt tgt cct atg gaa gag cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt
  S C P M E E R G V M A L I K R I A H S F
ggg ttg cgt gaa gat ata tct acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg
  G L R E D I S T K R D S A P L K D K A T
gtt tct aac ttg aaa gag aag att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat
  V S N L K E K I V F S P Q D S E D N V H
gtg caa tca aaa tca cct ttc aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
  V Q S K S P F N Y E K D Q L E I P A
```

C\_15-108

```

aggct ctt gaa ggc gtc atc cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat
  A   L   E   G   V   I   R   V   S   V   V   V   A   T   G   I   D   N   R   F   H
aga gat aaa gat gat gat caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca
  R   D   K   D   D   D   D   Q   K   N   S   L   D   S   E   N   E   P   F   A
aac tca aaa cta ttc aat att tcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat
  N   S   K   L   F   N   I   S   S   R   K   L   T   N   D   H   H   V   A   H
gat aat gaa gtc gtt aag gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att
  D   N   E   V   V   K   D   S   S   L   I   Q   N   K   E   M   M   D   N   I
aat cat gat aaa aca gat gtt tct gta aaa gag ggg gag aaa gat ttt ttt att aat gaa
  N   H   D   K   T   D   V   S   V   K   E   G   E   K   D   F   F   I   N   E
gat att atc cct gaa tct tct aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata tct ata gag gaa
  D   I   I   P   E   S   S   N   P   H   R   H   V   P   K   I   S   I   E   E
agt tat cct atg gaa gag cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt
  S   Y   P   M   E   E   R   G   V   M   A   L   I   K   R   I   A   H   S   F
ggt ttg cgt gaa gat ata tct acg aag agg gat tct gtg cct tta aaa gat aag gct acg
  G   L   R   E   D   I   S   T   K   R   D   S   V   P   L   K   D   K   A   T
gtt tct aac ttg aaa gag aat att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat
  V   S   N   L   K   E   N   I   V   S   S   P   Q   D   S   E   D   N   V   H
gtg caa tca aaa tca cct ttc aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
  V   Q   S   K   S   P   F   N   Y   E   K   D   Q   L   E   I   P   A

```

C\_18\_1\_C3

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
  V   S   V   V   A   T   G   I   D   N   R   F   H   R   D   K   D   D   D   D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
  Q   K   N   S   L   D   S   E   N   E   P   F   A   N   S   K   L   F   N   I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
  A   S   R   K   L   T   N   D   Q   H   V   A   H   D   N   E   V   V   K   D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
  S   S   L   I   Q   N   K   E   M   D   N   I   N   H   D   K   T   D   V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
  P   V   K   E   G   E   K   D   F   F   I   N   E   D   I   I   P   E   S   S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
  N   P   H   R   H   V   P   K   I   F   I   E   E   S   C   P   M   E   E   R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
  G   V   M   A   L   I   K   R   I   A   H   S   F   G   L   R   E   D   I   S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
  T   K   R   D   S   A   P   L   K   D   K   A   T   V   S   N   L   K   E   K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
  I   V   F   S   P   Q   D   S   E   D   N   V   H   V   Q   S   K   S   P   F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
  N   Y   E   K   D   Q   L   E   I   P   A

```

C\_18\_2\_C2

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
  V   S   V   V   A   T   G   I   D   N   R   F   H   R   D   K   D   D   D   D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
  Q   K   N   S   L   D   S   E   N   E   P   F   A   N   S   K   L   F   N   I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
  A   S   R   K   L   T   N   D   Q   H   V   A   H   D   N   E   V   V   K   D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
  S   S   L   I   Q   N   K   E   M   M   D   N   I   N   H   D   K   T   D   V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
  P   V   K   E   G   E   K   D   F   F   I   N   E   D   I   I   P   E   S   S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
  N   P   H   R   H   V   P   K   I   F   I   E   E   S   C   P   M   E   E   R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
  G   V   M   A   L   I   K   R   I   A   H   S   F   G   L   R   E   D   I   S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
  T   K   R   D   S   A   P   L   K   D   K   A   T   V   S   N   L   K   E   K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
  I   V   F   S   P   Q   D   S   E   D   N   V   H   V   Q   S   K   S   P   F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
  N   Y   E   K   D   Q   L   E   I   P   A

```

## C\_18\_3\_C7

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_4\_C4

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggg gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_5\_C15

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_6\_C4

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggg gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_12\_C2

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_1\_P4L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_1\_P6L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_2\_P3L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggg gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cca gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_3\_P6L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggg gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_3\_P10L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggg gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_3\_P15L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## C\_18\_6\_P4L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

D\_16-004

```

aggct ctt gaa ggc gtc atc cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat
A   L   E   G   V   I   R   V   S   V   V   A   T   G   I   D   N   R   F   H
aga gat aaa gat gat gat gat caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca
R   D   K   D   D   D   D   Q   K   N   S   L   D   S   E   N   E   P   F   A
aac tca aaa cta ttc aat att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat
N   S   K   L   F   N   I   A   S   R   K   L   T   N   D   H   H   V   A   H
gat aat gaa gtc gtt aag gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att
D   N   E   V   V   K   D   S   S   L   I   Q   N   K   E   M   M   D   N   I
aat cat gat aaa aca gat gtt ttt gta aaa gag ggg gat aaa gat ttt ttt att aat gaa
N   H   D   K   T   D   V   S   V   K   E   G   D   K   D   F   F   I   N   E
gat att atc cct gaa tct tct aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata tct ata gag gaa
D   I   I   P   E   S   S   N   P   H   R   H   V   P   K   I   S   I   E   E
agt tat cct atg gaa gag cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt
S   Y   P   M   E   E   R   G   V   M   A   L   I   K   R   I   A   H   S   F
ggt ttg cgt gaa gat ata tct acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg
G   L   R   E   D   I   S   T   K   R   D   S   A   P   L   K   D   K   A   T
gtt tct aac ttg aaa gag aag att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat
V   S   N   L   K   E   K   I   V   S   S   P   Q   D   S   E   D   N   V   H
gtg caa tca aaa tca cct ttc aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
V   Q   S   K   S   P   F   N   Y   E   K   D   Q   L   E   I   P   A

```

D\_ISR100

```

aggct ctt gaa ggc gtc atc cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat
A   L   E   G   V   I   R   V   S   V   V   A   T   G   I   D   N   R   F   H
aga gat aaa gat gat gat gat caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca
R   D   K   D   D   D   D   Q   K   N   S   L   D   S   E   N   E   P   F   A
aac tca aaa cta ttc aat att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat
N   S   K   L   F   N   I   A   S   R   K   L   T   N   D   H   H   V   A   H
gat aat gaa gtc gtt aag gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att
D   N   E   V   V   K   D   S   S   L   I   Q   N   K   E   M   M   D   N   I
cat cat gat aaa aca gat gtt ttt gta aaa gag ggg gat aaa gat ttt ttt att aat gaa
H   H   D   K   T   D   V   F   V   K   E   G   D   K   D   F   F   I   N   E
gat att atc cct gaa tct tct aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata tct ata gag gaa
D   I   I   P   E   S   S   N   P   H   R   H   V   P   K   I   S   I   E   E
agt tat cct atg gaa gag cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt
S   Y   P   M   E   E   R   G   V   M   A   L   I   K   R   I   A   H   S   F
ggt ttg cgt gaa gat ata tct acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg
G   L   R   E   D   I   S   T   K   R   D   S   A   P   L   K   D   K   A   T
gtt tct aac ttg aaa gag aag att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat
V   S   N   L   K   E   K   I   V   S   S   P   Q   D   S   E   D   N   V   H
gtg caa tca aaa tca cct ttc aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
V   Q   S   K   S   P   F   N   Y   E   K   D   Q   L   E   I   P   A

```

A\_NZ1

```

aggct ctt gaa ggc gtc atc cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gac aat cgt ttt cat
A   L   E   G   V   I   R   V   S   V   V   A   T   G   I   D   N   R   F   H
aga gat aaa gat gat gat gat caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca
R   D   K   D   D   D   D   Q   K   N   S   L   D   S   E   N   E   P   F   A
aat tca aaa cta ttc aat att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat
N   S   K   L   F   N   I   A   S   R   K   L   T   N   D   H   H   V   A   H
gat aat gaa gtc gtt aag gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att
D   N   E   V   V   K   D   S   S   L   I   Q   N   K   E   M   M   D   N   I
aat cat gat aaa aca gat gtt tct gta aaa gag ggg gag aaa gat ttt ttt att aat gaa
N   H   D   K   T   D   V   S   V   K   E   G   E   K   D   F   F   I   N   E
gat att atc cct gaa tct tct aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata tct ata gag gaa
D   I   I   P   E   S   S   N   P   H   R   H   V   P   K   I   S   I   E   E
agt tat cct atg gaa gag cgg ggt gtt atg aca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt
S   Y   P   M   E   E   R   G   V   M   T   L   I   K   R   I   A   H   S   F
ggt ttg cgt gaa gat ata tct acg cag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg
G   L   R   E   D   I   S   T   Q   R   D   S   A   P   L   K   D   K   A   T
gtt tct aac ttg aaa gag aag att gtt tct tct cat caa gat tca gaa gat aat gtt cat
V   S   N   L   K   E   K   I   V   S   S   H   Q   D   S   E   D   N   V   H
gtg caa tca aaa tca act ttc aat cat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
V   Q   S   K   S   T   F   N   H   E   K   D   Q   L   E   I   P   A

```



## B\_ZC1

```

aggct ctt gaa ggc gtc atc cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gac aat cgt ttt cat
  A L E G V I R V S V V A T G I D N R F H
aga gat aaa gat gat gat caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gaa
  R D K D D D D Q K N S L D S E N E P F E
aac tca aaa cta ttc aat att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat
  N S K L F N I A S R K L T N D H H V A H
gat aat gaa gtc gtt aag gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att
  D N E V V K D S S L I Q N K E M M D N I
aat cat gat aaa aca gat gtt tct gta aaa gag ggg gag aaa gat ttt ttt att aat gaa
  N H D K T D V S V K E G E K D F F I N E
gat att atc ccc gaa tct tct aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata tct ata gag gaa
  D I I P E S S N P H R H V P K I S I E E
aat tat cct ata gaa gag cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt
  N Y P I E E R G V M A L I K R I A H S F
ggt ttg cgt gaa gat ata tct acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg
  G L R E D I S T K R D S A P L K D K A T
gtt tct aac ttg aaa gag aag att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gag aat gtt cat
  V S N L K E K I V S S P Q D S E E N V H
gta caa tca aaa tca cct ttc aat cat gaa aaa gat caa tta gaa ata cct gct
  V Q S K S P F N H E K D Q L E I P A

```

## H\_13-356

```

aggct ctt gaa ggc atc atc cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat
  A L E G I I R V S V V A T G I D N R F H
aaa gat aaa gat gat gat gat caa aaa aaa tct ctt gat tca gag aat gca tct ttt
  K D K D D D D Q K K S L D S E N A S F
gaa aac tca aaa cta ttc aat att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg
  E N S K L F N I A S R K L T N D H H V A
cat gat aat gaa gtc gtt aag gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat
  H D N E V V K D S S L I Q N K E M M D N
att aat cat tat aaa aca gat gtt tct gta aag gag gga gaa aaa gat ttt ttt att aat
  I N H Y K T D V S V K E G E K D F F I N
gaa gat att atc cct gaa tct tct aat cca cat cgg cat gtt cct caa atg tct ata gag
  E D I I P E S S N P H R H V P Q M S I E
gaa agt tat tct atg gaa gag cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gca cac tct
  E S Y S M E E R G V M A L I K R I A H S
ttt ggt ttg cat gaa gat ata tct acg aag atg gat tct gca cct tta aaa gat aag gct
  F G L H E D I S T K M D S A P L K D K A
acg gtt tct aac ttg aaa gag aag att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt
  T V S N L K E K I V S S P Q D S E D N V
cat gta caa tca aaa tca cct ttc aat tgt gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
  H V Q S K S P F N C E K D Q L E I P A

```

## CLas\_Ishi-1

```

aagcg ctt gaa ggt gtg att cgt gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gag aat cgt ttg cat
  A L E G V I R V S V V A T G I E N R L H
aga gat ggt gat gat aat cga gat agc tct ctg aca acg cat gaa tct tta aaa aac gca
  R D G D D N R D S S L T T H E S L K N A
aaa ttt ttg aat ctt tct tcc caa aaa tta ccg gtg gaa gat tct cat gtt atg cat cat
  K F L N L S S P K L P V E D S H V M H H
agt gta atc gct gaa aat gct cac tgc acc gac aat caa gaa gat tta aat aac caa gaa
  S V I A E N A H C T D N Q E D L N N Q E
aat tct ttg gta gga gat caa aat caa gaa ttg ttt tta gag gaa gat gtt gtt cca gaa
  N S L V G D Q N Q E L F L E E D V V P E
tct tct gct cca cat cgt ctc ata tct cgg caa aga cat agt gac tct gtc gaa gag cgt
  S S A P H R L I S R Q R H S D S V E E R
ggg gtg atg gca tta att aaa cgt att gca cac tct ttt ggt ttg cat gaa aat att gct
  G V M A L I K R I A H S F G L H E N I A
tca gaa gaa gat tcc gtt cgt atg aaa agt gaa tct acg gtt tct tat ttg aga gaa aga
  S E E D S V R M K S E S T V S Y L R E R
aac cct tct atc tct gaa gag agc att gat gat ttt tgt gta caa tca aag cca act gtt
  N P S I S E E S I D D F C V Q S K P T V
aag tgt gag gaa gat aaa tta gag ata cct gct
  K C E E D K L E I P A

```

## H\_18\_11\_P1L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aaa gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H K D K D D D D
gat caa aaa aaa tct ctt gat tca gag aat gca tct ttt gaa aac tca aaa cta ttc aat
D Q K K S L D S E N A S F E N S K L F N
att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag
I A S R K L T N D H H V A H D N E V V K
gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat tat aaa aca gat
D S S L I Q N K E M M D N I N H Y K T D
gtt tct gta aag gag gga gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct
V S V K E G E K D F F I N E D I I P E S
tct aat cca cat cgg cat gtt cct caa atg tct ata gag gaa agt tat tct atg gaa gag
S N P H R H V P Q M S I E E S Y S M E E
cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gca cac tct ttt ggt ttg cat gaa gat ata
R G V M A L I K R I A H S F G L H E D I
tct acg aag atg gat tct gca cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag
S T K M D S A P L K D K A T V S N L K E
aag att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gta caa tca aaa tca cct
K I V S S P Q D S E D N V H V Q S K S P
ttc aat tgt gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
F N C E K D Q L E I P A

```

## H\_18\_11\_P3L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aaa gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H K D K D D D D
gat caa aaa aaa tct ctt gat tca gag aat gca tct ttt gaa aac tca aaa cta ttc aat
D Q K K S L D S E N A S F E N S K L F N
att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag
I A S R K L T N D H H V A H D N E V V K
gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat tat aaa aca gat
D S S L I Q N K E M M D N I N H Y K T D
gtt tct gta aag gag gga gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct
V S V K E G E K D F F I N E D I I P E S
tct aat cca cat cgg cat gtt cct caa atg tct ata gag gaa agt tat tct atg gaa gag
S N P H R H V P Q M S I E E S Y S M E E
cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gca cac tct ttt ggt ttg cat gaa gat ata
R G V M A L I K R I A H S F G L H E D I
tct acg aag atg gat tct gca cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag
S T K M D S A P L K D K A T V S N L K E
aag att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gta caa tca aaa tca cct
K I V S S P Q D S E D N V H V Q S K S P
ttc aat tgt gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
F N C E K D Q L E I P A

```

## H\_18\_11\_P7L

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aaa gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H K D K D D D D
gat caa aaa aaa tct ctt gat tca gag aat gca tct ttt gaa aac tca aaa cta ttc aat
D Q K K S L D S E N A S F E N S K L F N
att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag
I A S R K L T N D H H V A H D N E V V K
gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat
D S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D
gtt tct gta aag gag gga gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct
V S V K E G E K D F F I N E D I I P E S
tct aat cca cat cgg cat gtt cct caa atg tct ata gag gaa agt tat tct atg gaa gag
S N P H R H V P Q M S I E E S Y S M E E
cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gca cac tct ttt ggt ttg cat gaa gat ata
R G V M A L I K R I A H S F G L H E D I
tct acg aag atg gat tct gca cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag
S T K M D S A P L K D K A T V S N L K E
aag att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gta caa tca aaa tca cct
K I V S S P Q D S E D N V H V Q S K S P
ttc aat tgt gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
F N C E K D Q L E I P A

```

## H\_18\_KT

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## H\_18\_T1

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aaa gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H K D K D D D D
gat caa aaa aaa tct ctt gat tca gag aat gca tct ttt gaa aac tca aaa cta ttc aat
D Q K K S L D S E N A S F E N S K L F N
att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag
I A S R K L T N D H H V A H D N E V V K
gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat tat aaa aca gat
D S S L I Q N K E M M D N I N H Y K T D
gtt tct gta aag gag gga gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct
V S V K E G E K D F F I N E D I I P E S
tct aat cca cat cgg cat gtt cct caa atg tct ata gag gaa agt tat tct atg gaa gag
S N P H R H V P Q M S I E E S Y S M E E
cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gca cac tct ttt ggt ttg cat gaa gat ata
R G V M A L I K R I A H S F G L H E D I
tct acg aag atg gat tct gca cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag
S T K M D S A P L K D K A T V S N L K E
aag att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gta caa tca aaa tca cct
K I V S S P Q D S E D N V H V Q S K S P
ttc aat tgt gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
F N C E K D Q L E I P A

```

## H\_18\_T2

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aaa gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H K D K D D D D
gat caa aaa aaa tct ctt gat tca gag aat gca tct ttt gaa aac tca aaa cta ttc aat
D Q K K S L D S E N A S F E N S K L F N
att gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cat cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag
I A S R K L T N D H H V A H D N E V V K
gat tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat
D S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D
gtt tct gta aag gag gga gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct
V S V K E G E K D F F I N E D I I P E S
tct aat cca cat cgg cat gtt cct caa atg tct ata gag gaa agt tat tct atg gaa gag
S N P H R H V P Q M S I E E S Y S M E E
cgg ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gca cac tct ttt ggt ttg cat gaa gat ata
R G V M A L I K R I A H S F G L H E D I
tct acg aag atg gat tct gca cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag
S T K M D S A P L K D K A T V S N L K E
aag att gtt tct tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gta caa tca aaa tca cct
K I V S S P Q D S E D N V H V Q S K S P
ttc aat tgt gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
F N C E K D Q L E I P A

```

H\_18\_T3

```

gta tct gtt gtt gcg acg gga ata gat aat cgt ttt cat aga gat aaa gat gat gat gat
V S V V A T G I D N R F H R D K D D D D
caa aaa aac tct ctt gat tca gag aat gaa cct ttt gca aac tca aaa cta ttc aat att
Q K N S L D S E N E P F A N S K L F N I
gcc tct cgt aaa ttg acg aat gat cag cat gtt gcg cat gat aat gaa gtc gtt aag gat
A S R K L T N D Q H V A H D N E V V K D
tct agt cta atc caa aat aaa gaa atg atg gat aat att aat cat gat aaa aca gat gtt
S S L I Q N K E M M D N I N H D K T D V
cct gta aaa gag ggt gaa aaa gat ttt ttt att aat gaa gat att atc cct gaa tct tct
P V K E G E K D F F I N E D I I P E S S
aat cca cat cgg cat gtt cct aaa ata ttt ata gag gaa agt tgt cct atg gaa gag cgg
N P H R H V P K I F I E E S C P M E E R
ggt gtt atg gca tta ata aaa cgt att gcg cac tct ttt ggt ttg cgt gaa gat ata tct
G V M A L I K R I A H S F G L R E D I S
acg aag agg gat tct gcg cct tta aaa gat aag gct acg gtt tct aac ttg aaa gag aag
T K R D S A P L K D K A T V S N L K E K
att gtt ttt tct cct caa gat tca gaa gat aat gtt cat gtg caa tca aaa tca cct ttc
I V F S P Q D S E D N V H V Q S K S P F
aat tat gaa aaa gat caa cta gaa ata cct gct
N Y E K D Q L E I P A

```

## BILAGA 7 SEKVENSLISTA AV GENREGIONEN *FTSZ* FÖR GENOTYP JÄMFÖRELSE AV '*CANDIDATUS LIBERIBACTER* *SOLANACEARUM*'.

A_NZ1	GCGACGGGAATAGACAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
B_ZC1	GCGACGGGAATAGACAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_13-12	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_15-167	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_15-214	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_15-P24a	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_1_C3	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_1_P4L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_1_P6L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_12_C2	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_2_C2	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_2_P3L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_3_C7	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_3_P10L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_3_P15L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_3_P6L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_4_C4	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_5_C15	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_6_C4	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_6_P4L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_KT	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
C_18_T3	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
D_16_004	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
D_ISR100	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
G_Herbarium51	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
G_Herbarium61	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
H_13-356	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGATGATCAAAAAAAC	60
H_16-KT3	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGATGATGATCAAAAAAAC	60
H_18_11_P1L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGATGATGATCAAAAAAAC	60
H_18_11_P3L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGATGATGATCAAAAAAAC	60
H_18_11_P7L	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGATGATGATCAAAAAAAC	60
H_18_T1	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGATGATGATCAAAAAAAC	60
H_18_T2	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGATGATGATCAAAAAAAC	60
U_15-108	GCGACGGGAATAGATAATCGTTTTTCATAGAGATAAAAGATGATGATGAT---CAAAAAAAC	57
A_NZ1	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
B_ZC1	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGAAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_13-12	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_15-167	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_15-214	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_15-P24a	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_1_C3	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_1_P4L	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_1_P6L	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_12_C2	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_2_C2	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_2_P3L	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_3_C7	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_3_P10L	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_3_P15L	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_3_P6L	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_4_C4	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_5_C15	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_6_C4	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_6_P4L	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_KT	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
C_18_T3	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
D_16-004	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
D_ISR100	TCTCTTGATTTCAGAGAATGAACCTTTTGCAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
G_Herbarium51	TCTCTTGATTTCAGAGAATGGAACCTTTTGAAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
G_Herbarium61	TCTCTTGATTTCAGAGAATGGAACCTTTTGAAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	117
H_13-356	TCTCTTGATTTCAGAGAATGCATCTTTTGAAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	120
H_16-KT3	TCTCTTGATTTCAGAGAATGCATCTTTTGAAAACCTCAAACCTATTCAATATTGCCTCTCGT	120

H_18_11_P1L	TCTCTTGATT	CAGAGAATGCATCTTTT	GAAAAC	TCAAAC	TATTC	CAATATTG	CCTCTCGT	120
H_18_11_P3L	TCTCTTGATT	CAGAGAATGCATCTTTT	GAAAAC	TCAAAC	TATTC	CAATATTG	CCTCTCGT	120
H_18_11_P7L	TCTCTTGATT	CAGAGAATGCATCTTTT	GAAAAC	TCAAAC	TATTC	CAATATTG	CCTCTCGT	120
H_18_T1	TCTCTTGATT	CAGAGAATGCATCTTTT	GAAAAC	TCAAAC	TATTC	CAATATTG	CCTCTCGT	120
H_18_T2	TCTCTTGATT	CAGAGAATGCATCTTTT	GAAAAC	TCAAAC	TATTC	CAATATTG	CCTCTCGT	120
U_15-108	TCTCTTGATT	CAGAGAATGAACCTTTT	GAAAAC	TCAAAC	TATTC	CAATATTG	CCTCTCGT	117

A_NZ1	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
B_ZC1	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_13-12	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_15-167	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_15-214	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_15-P24a	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_1_C3	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_1_P4L	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_1_P6L	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_12_C2	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_2_C2	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_2_P3L	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_3_C7	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_3_P10L	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_3_P15L	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_3_P6L	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_4_C4	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_5_C15	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_6_C4	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_6_P4L	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_KT	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
C_18_T3	AAATTGACGAATGATCAGCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
D_16-004	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
D_ISR100	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
G_Herbarium51	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
G_Herbarium61	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177
H_13-356	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	180
H_16-KT3	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	180
H_18_11_P1L	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	180
H_18_11_P3L	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	180
H_18_11_P7L	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	180
H_18_T1	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	180
H_18_T2	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	180
U_15-108	AAATTGACGAATGATCATCATGTTGCGCATGATAATGAAGTCGTTAAGGATTCTAGTCTA	177

A_NZ1	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
B_ZC1	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_13-12	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_15-167	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_15-214	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_15-P24a	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_1_C3	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_1_P4L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_1_P6L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_12_C2	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_2_C2	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_2_P3L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_3_C7	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_3_P10L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_3_P15L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_3_P6L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_4_C4	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_5_C15	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_6_C4	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_6_P4L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_KT	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
C_18_T3	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
D_16-004	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTTTGTAAAA	237
D_ISR100	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTCATCATGATAAAACAGATGTTTTTGTAAAA	237
G_Herbarium51	ATCCAAAGTAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
G_Herbarium61	ATCCAAAGTAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
H_13-356	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATTATATAAAACAGATGTTTCTGTAAAG	240
H_16-KT3	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATTATATAAAACAGATGTTTCTGTAAAG	240

H_18_11_P1L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATTATAAAAACAGATGTTTCTGTAAAG	240
H_18_11_P3L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATTATAAAAACAGATGTTTCTGTAAAG	240
H_18_11_P7L	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAAACAGATGTTTCTGTAAAG	240
H_18_T1	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATTATAAAAACAGATGTTTCTGTAAAG	240
H_18_T2	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAAACAGATGTTTCTGTAAAG	240
U_15-108	ATCCAAAATAAAGAAATGATGGATAATATTAATCATGATAAAAACAGATGTTTCTGTAAAA	237
A_NZ1	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
B_ZC1	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_13-12	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_15-167	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_15_214	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_15-P24a	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_1_C3	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_1_P4L	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_1_P6L	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_12_C2	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_2_C2	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_2_P3L	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_3_C7	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_3_P10L	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_3_P15L	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_3_P6L	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_4_C4	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_5_C15	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_6_C4	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_6_P4L	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_KT	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
C_18_T3	GAGGGTGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
D_16-004	GAGGGGGATAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
D_ISR100	GAGGGGGATAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
G_Herbarium51	GAGGGGGATAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
G_Herbarium61	GAGGGGGATAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
H_13-356	GAGGGAGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	300
H_16-KT3	GAGGGAGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	300
H_18_11_P1L	GAGGGAGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	300
H_18_11_P3L	GAGGGAGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	300
H_18_11_P7L	GAGGGAGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	300
H_18_T1	GAGGGAGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	300
H_18_T2	GAGGGAGAAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	300
U_15-108	GAGGGGGAGAAAAGATTTTTTTTATTAATGAAGATATTATCCCTGAATCTTCTAATCCACAT	297
A_NZ1	CGGCATGTTCCATAAAATATCTATAGAGGAAAAGTTATCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
B_ZC1	CGGCATGTTCCATAAAATATCTATAGAGGAAAAGTTATCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_13-12	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_15-167	CGGCATGTTCCATAAAATATCTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_15-214	CGGCATGTTCCATAAAATATCTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_15-P24a	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_1_C3	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_1_P4L	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_1_P6L	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_12_C2	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_2_C2	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_2_P3L	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_3_C7	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_3_P10L	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_3_P15L	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_3_P6L	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_4_C4	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_5_C15	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_6_C4	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_6_P4L	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_KT	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
C_18_T3	CGGCATGTTCCATAAAATATTTATAGAGGAAAAGTTGTCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
D_16-004	CGGCATGTTCCATAAAATATCTATAGAGGAAAAGTTATCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
D_ISR100	CGGCATGTTCCATAAAATATCTATAGAGGAAAAGTTATCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
G_Herbarium51	CGGCATGTTCCATAAAATATCTATAGAGGAAAAGTTATCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
G_Herbarium61	CGGCATGTTCCATAAAATATCTATAGAGGAAAAGTTATCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
H_13-356	CGGCATGTTCCATAAATGTCTATAGAGGAAAAGTTATCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	360
H_16-KT3	CGGCATGTTCCATAAATGTCTATAGAGGAAAAGTTATCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	360

H_18_11_P1L	CGGCATGTTCTCAAATGTCTATAGAGGAAAGTTATTCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	360
H_18_11_P3L	CGGCATGTTCTCAAATGTCTATAGAGGAAAGTTATTCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	360
H_18_11_P7L	CGGCATGTTCTCAAATGTCTATAGAGGAAAGTTATTCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	360
H_18_T1	CGGCATGTTCTCAAATGTCTATAGAGGAAAGTTATTCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	360
H_18_T2	CGGCATGTTCTCAAATGTCTATAGAGGAAAGTTATTCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	360
U_15-108	CGGCATGTTCTAAAATATCTATAGAGGAAAGTTATCCTATGGAAGAGCGGGGTGTTATG	357
A_NZ1	ACATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAGAGG	417
B_ZC1	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_13-12	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_15-167	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_15-214	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_15-P24a	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_1_C3	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_1_P4L	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_1_P6L	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_12_C2	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_2_C2	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_2_P3L	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_3_C7	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_3_P10L	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_3_P15L	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_3_P6L	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_4_C4	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_5_C15	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_6_C4	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_6_P4L	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_KT	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
C_18_T3	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
D_16-004	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
D_ISR100	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
G_Herbarium51	GCATTAATAAAAACGTATTGTGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
G_Herbarium61	GCATTAATAAAAACGTATTGTGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
H_13-356	GCATTAATAAAAACGTATTGCACACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGATG	420
H_16-KT3	GCATTAATAAAAACGTATTGCACACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGATG	420
H_18_11_P1L	GCATTAATAAAAACGTATTGCACACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGATG	420
H_18_11_P3L	GCATTAATAAAAACGTATTGCACACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGATG	420
H_18_11_P7L	GCATTAATAAAAACGTATTGCACACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGATG	420
H_18_T1	GCATTAATAAAAACGTATTGCACACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGATG	420
H_18_T2	GCATTAATAAAAACGTATTGCACACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGATG	420
U_15-108	GCATTAATAAAAACGTATTGCGCACTCTTTTGGTTTGCGTGAAGATATATCTACGAAGAGG	417
A_NZ1	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
B_ZC1	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_13-12	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_15-167	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_15-214	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_15-P24a	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_1_C3	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_1_P4L	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_1_P6L	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_12_C2	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_2_C2	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_2_P3L	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_3_C7	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_3_P10L	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_3_P15L	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_3_P6L	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_4_C4	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_5_C15	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_6_C4	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_6_P4L	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_KT	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
C_18_T3	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
D_16-004	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
D_ISR100	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	477
G_Herbarium51	GATTCTGCGCCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAAATTGTTTCT	477
G_Herbarium61	GATTCTGCACCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAAATTGTTTCT	477
H_13-356	GATTCTGCACCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	480
H_16-KT3	GATTCTGCACCTTTAAAAGATAAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	480



H_18_11_P1L	GATTCTGCACCTTTAAAAGATAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	480
H_18_11_P3L	GATTCTGCACCTTTAAAAGATAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	480
H_18_11_P7L	GATTCTGCACCTTTAAAAGATAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	480
H_18_T1	GATTCTGCACCTTTAAAAGATAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	480
H_18_T2	GATTCTGCACCTTTAAAAGATAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAAGATTGTTTCT	480
U_15-108	GATTCTGTGCCTTTAAAAGATAAGGCTACGGTTTCTAACTTGAAAGAGAATATTGTTTCT	477
A_NZ1	TCTCATCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACTTTCAATCATGAA	537
B_ZC1	TCTCCTCAAGATTCAGAAGAGAAATGTTTCATGTACAATCAAAATCACCTTTCAATCATGAA	537
C_13-12	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_15-167	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_15-214	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_15-P24a	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_1_C3	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_1_P4L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_1_P6L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_12_C2	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_2_C2	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_2_P3L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_3_C7	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_3_P10L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_3_P15L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_3_P6L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_4_C4	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_5_C15	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_6_C4	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_6_P4L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_KT	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
C_18_T3	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
D_16-004	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
D_ISR100	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
G_Herbarium51	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
G_Herbarium61	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537
H_13-356	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTACAATCAAAATCACCTTTCAATTGTGAA	540
H_16-KT3	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTACAATCAAAATCACCTTTCAATTGTGAA	540
H_18_11_P1L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTACAATCAAAATCACCTTTCAATTGTGAA	540
H_18_11_P3L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTACAATCAAAATCACCTTTCAATTGTGAA	540
H_18_11_P7L	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTACAATCAAAATCACCTTTCAATTGTGAA	540
H_18_T1	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTACAATCAAAATCACCTTTCAATTGTGAA	540
H_18_T2	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTACAATCAAAATCACCTTTCAATTGTGAA	540
U_15-108	TCTCCTCAAGATTCAGAAGATAATGTTTCATGTGCAATCAAAATCACCTTTCAATTATGAA	537

A_NZ1	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
B_ZC1	AAAGATCAATTAGAAATACCTGCT	561
C_13-12	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_15-167	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_15-214	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_15-P24a	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_1_C3	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_1_P4L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_1_P6L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_12_C2	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_2_C2	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_2_P3L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_3_C7	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_3_P10L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_3_P15L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_3_P6L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_4_C4	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_5_C15	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_6_C4	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_6_P4L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_KT	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
C_18_T3	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
D_16-004	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
D_ISR100	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
G_Herbarium51	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
G_Herbarium61	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561
H_13-356	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	564
H_16-KT3	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	564
H_18_11_P1L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	564
H_18_11_P3L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	564
H_18_11_P7L	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	564
H_18_T1	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	564
H_18_T2	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	564
U_15-108	AAAGATCAACTAGAAATACCTGCT	561

**BILAGA 8 UPPSTÄLLNING AV GENREGIONEN *FTSZ* PROTEINSAMMANSÄTTNING FÖR JÄMFÖRELSE AV GENOTYPER AV '*CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM*'.**

Species/Abbrev	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*</
----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-----

Bild I. Proteinuppsättning från 1-86.

